



**Mauro Diogo Batista  
dos Santos**

**Efeito da pressão e temperatura em suspensões de  
amido**





**Mauro Diogo Batista  
dos Santos**

**Efeito da pressão e temperatura em suspensões de  
amido**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia, realizada sob a orientação científica da Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes, Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro e Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro.



Dedico este trabalho à minha família e namorada pelo apoio incondicional



## **o júri**

presidente

**Prof. Doutora Ivonne Delgadillo Giraldo**

Professora Associada com agregação do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes**

Professora Associada do Departamento de Química da Universidade de Aveiro

**Prof. Doutora Maria Helena Figueiredo Godinho**

Professora auxiliar com agregação do Departamento de Ciências dos Materiais da Universidade Nova de Lisboa

**Prof. Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva**

Investigador Auxiliar do Departamento de Química da Universidade de Aveiro





## **agradecimentos**

O meu agradecimento à minha orientadora, Doutora Maria Teresa Seabra dos Reis Gomes e coorientador Doutor Jorge Manuel Alexandre Saraiva, que foram determinantes para a concretização deste trabalho, pela orientação, compreensão, apoio, confiança e motivação que sempre me transmitiram.

À Doutora Maria Helena Figueiredo Godinho por me ter facilitado o acesso ao microscópio de luz polarizada que me permitiu visualizar os grânulos de amido durante a gelatinização.

À Doutora Marta Veríssimo pela ajuda na montagem do sistema do sensor acústico e Mestre Sandra Magina pela ajuda no DSC.

Aos meus pais, irmãos e avós que me apoiaram ao longo de toda a vida, pelo afeto, paciência e confiança que sempre demonstraram no meu trabalho. A eles devo o que sou e o que tenho, sem eles nada disto seria possível.

À minha namorada Margarida Silva, um agradecimento muito especial pelo apoio incondicional e constante ao longo do meu percurso académico, pela força que sempre me transmitiu nos bons e maus momentos da vida. Todas as palavras são poucas para lhe agradecer.

Aos meus amigos e colegas de laboratório, Nuno Valente, Sara Barone e especialmente Lúcia Venâncio, que sempre me ajudaram em tudo o que foi necessário. O apoio e motivação transmitidos foram fundamentais para os objetivos atingidos neste trabalho.

A todos os meus amigos que de alguma forma contribuíram para superar todas as dificuldades.



## palavras-chave

amido, sensor acústico, cristal piezoelétrico de quartzo, alta pressão, gelatinização

## resumo

O objetivo do presente trabalho consistiu no estudo das propriedades viscoelásticas de suspensões de amido nativo e processado a alta pressão. Foi utilizado um sensor acústico de forma a analisar as propriedades das suspensões, sendo depois recolhidas informações complementares através de outras técnicas: calorimetria diferencial de varrimento, microscopia de luz polarizada e microscopia eletrónica de varrimento.

Neste trabalho foram realizados estudos com amido de milho nativo e processado a alta pressão (500 MPa, 5 minutos, temperatura ambiente), tendo-se verificado que a suspensão do amido processado apresentava propriedades viscoelásticas muito diferentes do amido nativo. A temperatura a que se iniciou o aumento da viscosidade foi mais elevada para o amido processado a alta pressão, e as variações observadas para temperaturas superiores a 70 °C foram menores.

Durante o arrefecimento foi detetada uma diminuição da viscosidade, correspondente a um aumento da organização molecular, com maior expressão no amido nativo mas que se dá no mesmo intervalo de temperatura, quer para este quer o processado a alta pressão.

Foi também possível concluir que a velocidade de aquecimento da amostra de amido influencia as propriedades viscoelásticas da suspensão e as temperaturas a que ocorrem as variações de viscosidade relacionadas com o processo de gelatinização do amido.

De assinalar também que no amido de milho se pode detetar pela variação da frequência do cristal piezoelétrico o rompimento dos grânulos e que apesar do estabelecimento de novas ligações e da reposição de alguma ordem molecular que se pode verificar durante o arrefecimento, a frequência da suspensão depois de arrefecida era muito diferente da suspensão de amido inicial. No amido de arroz, a temperatura a que se inicia o aumento de viscosidade foi superior à que se observou para o amido de milho, indicio da maior resistência do amido de arroz, para o qual não se detetou sinal de rutura dos grânulos. A frequência final da suspensão do mesmo, depois de arrefecido, era igual à inicial.

Com o amido de arroz foi feito o estudo da influência da temperatura no processamento de alta pressão, tendo sido processadas suspensões a 400 MPa, durante 15 minutos, a 5, 10, 23 e 34 °C. As propriedades viscoelásticas foram analisadas com recurso a um sensor acústico, tendo-se verificado que quanto maior a temperatura de processamento a alta pressão, mais elevada a temperatura necessária para que se inicie o aumento de viscosidade e menores as temperaturas a que se inicia diminuição da mesma durante o arrefecimento.



**keywords**

starch, acoustic wave sensor, piezoelectric quartz crystal, high pressure, gelatinization

**abstract**

The aim of this work was to study the viscoelastic properties of native and high-pressure-treated starch suspensions. An acoustic wave sensor was used to analyze the suspensions, and those studies were complemented with other data obtained by other techniques: differential scanning calorimetry, polarized light microscopy and scanning electron microscopy.

Studies have been conducted with native and high-pressure-treated maize starch (500 MPa, 5 minutes, room temperature). It was found that the high-pressure-treated starch suspensions presented viscoelastic properties different from native starch. The onset temperature of viscosity increase is higher for the high-pressure-treated starch, although the changes in viscosity observed at temperatures above 70 ° C were smaller.

During cooling, a decrease in viscosity was detected, which corresponded to an increase in molecular organization. The magnitude of the frequency shift was higher for native starch, although it was observed within the same temperature range, for native and high-pressure-treated starch.

It was also possible to conclude that the heating rate of starch influences the suspension viscoelastic properties and the temperatures of viscosity changes related to the starch gelatinization process.

It should be noted that in the maize starch a change in the piezoelectric crystal frequency due to the breaking of the granules was detected. Despite the establishment of new connections and the recover of some molecular order, which was evidenced during cooling, the frequency of the crystal in contact with the suspension after cooling was very different from the initial frequency.

In rice starch, the temperature at which the viscosity increase begins was higher than for the maize starch. Higher resistance index for rice starch was detected, with no rupture of the granules. After cooling, the frequency of the crystal in contact with the suspension was equal to the initial frequency.

Also for rice starch the influence of temperature on high-pressure-treated starch was studied. Suspensions were treated at pressures of 400 MPa for 15 minutes at 5, 10, 23 and 34 ° C. The viscoelastic properties were studied using an acoustic wave sensor. It was found that the higher the processing temperature, the higher the temperature at which the viscosity increase began and the lowest the temperatures at which there was a decrease in viscosity during cooling.



# Índice

Índice de figuras .....	iii
Índice de tabelas .....	v
1 - Introdução .....	1
2 - Amido .....	7
2.1 - Amilose e Amilopectina .....	9
2.2 - O grânulo de amido.....	10
2.3 - Cristalinidade dos grânulos.....	13
2.4 - Complexo amido-lípido .....	15
2.5 - Digestão enzimática e Amido Resistente.....	16
2.6 - Propriedades funcionais do amido .....	18
3 - Técnicas usadas no estudo do amido .....	21
3.1 - Introdução .....	23
3.2 - Microscopia eletrônica de varrimento (SEM).....	24
3.3 - Microscopia de luz polarizada .....	24
3.4 - Calorimetria diferencial de varrimento (DSC).....	26
3.5 - Sensor acústico .....	28
4 - Alta Pressão .....	31
4.1 - Introdução .....	33
4.2 - Processamentos de amido a alta pressão.....	35
5 - Material e métodos.....	41
5.1 - Reagentes .....	43
5.2 - Preparação das suspensões de amido .....	43
5.3 - Processamento de alta pressão.....	43
5.4 - Microscopia eletrônica de varrimento.....	44
5.5 - Microscopia de luz polarizada .....	44

5.6 - DSC.....	44
5.7 - Sensor acústico .....	45
6 - Resultados e discussão de resultados .....	47
6.1 - Morfologia externa do amido de milho.....	49
6.2 - Gelatinização, “ <i>pasting</i> ” e retrogradação do amido de milho.....	53
6.3 - Comportamento térmico do amido de arroz após diversos tratamentos de alta pressão. 72	
7 - Conclusão.....	77
Bibliografia .....	83



## Índice de figuras

Figura 1 – Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B) [12] .....	9
Figura 2 – Representação dos anéis de crescimento no interior do grânulo de amido – camadas semicristalinas e amorfas do grânulo de amido (a), ampliação da camada semicristalina onde se verifica a alternância da lamela cristalina com a amorfa (b), representação das cadeias de amilopectina de acordo com as lamelas cristalinas e amorfas (c). Adaptado ref. [11] .....	11
Figura 3 – Representação da disposição das estruturas de dupla hélice de acordo com a cristalinidade tipo A e B. Adaptado ref. [21] .....	13
Figura 4 – Representação esquemática do complexo de amilose com duas moléculas de palmitato de glicerol [1].....	15
Figura 5 – Esquema dos processos que ocorrem no amido durante aquecimento, arrefecimento e armazenamento. Adaptado ref. [44] .....	19
Figura 6 – Grânulos de amido de milho nativo com ampliação de 200x e WD de 15 mm.....	49
Figura 7 – Grânulos de amido de milho nativo com ampliação de 2500x e WD de 16,6 mm .....	49
Figura 8 – Grânulos de amido de milho processado a alta pressão com ampliação de 200x e WD de 16,6 mm .....	50
Figura 9 – Grânulos de amido de milho processado a alta pressão com ampliação de 2500x e WD de 16,6 mm .....	50
Figura 10 – Monitorização de um único grânulo de amido nativo (suspensão 2,5% w/v) nos últimos instantes de perda de birrefringência, velocidade de aquecimento 2,0 °C/min.....	53
Figura 11 – Evolução da perda de birrefringência dos grânulos de amido nativo (suspensão 2,5% w/v), velocidade de aquecimento 2,0 °C/min.....	54
Figura 12 – Evolução da perda de birrefringência dos grânulos de amido processado por alta pressão (suspensão 2,5% w/v), velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	55
Figura 13 – Resultado obtido por DSC para uma amostra de amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Aquecimento efetuado entre 20 e 85 °C a uma velocidade de 20 °C/min.....	58

Figura 14 – Resultado obtido por DSC para uma amostra de amido de milho processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v). Aquecimento efetuado entre 20 e 85 °C a uma velocidade de 20 °C/min.....	59
Figura 15 – Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	62
Figura 16 – Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 1,0 °C/min.....	66
Figura 17 – Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 0,5 °C/min.....	66
Figura 18 – Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	69
Figura 19 – Frequência em função da temperatura para amido de arroz nativo (suspensão 1,5% w/w), com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	72
Figura 20 – Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a 5 °C, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	73
Figura 21 – Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a 10 °C, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	74
Figura 22 – Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a temperatura ambiente, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	74
Figura 23 – Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a 34 °C, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	75

## Índice de tabelas

Tabela 1 – Padrão de difração de raio-x (cristalinidade) característico de algumas fontes de amido [21, 24-27].....	14
Tabela 2 – Temperatura inicial, pico, final, gelatinização e $\Delta H$ de transição obtido no DSC para o amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v).....	59
Tabela 3 – Temperatura inicial, pico, final, gelatinização e $\Delta H$ de transição obtido no DSC para o amido de milho processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v).....	60
Tabela 4 – Temperaturas características obtidas no sensor acústico para 3 amostras de amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v) com aquecimento de 2,0 °C/min.....	63
Tabela 5 – Temperaturas características obtidas no sensor acústico, a várias velocidades de aquecimento, para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v).....	67
Tabela 6 – Temperaturas características obtidas no sensor acústico, com aquecimento de 2,0 °C/min, para 3 réplicas de amido processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v).....	69
Tabela 7 – Temperaturas características obtidas no sensor acústico para amido de milho nativo e processado a alta pressão (suspensões 2,5% w/v), com uma velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.....	70
Tabela 8 – Temperaturas características de 3 réplicas de amido de arroz nativo e processado a alta pressão (suspensões 1,5% w/w) a diferentes temperaturas. A temperatura evidenciada ( <b>negrito</b> ) corresponde à mediana das temperaturas características observadas.....	75



# 1 - Introdução



A vida do ser humano tem sofrido diversas modificações ao longo do tempo, com alteração dos seus hábitos. A alimentação não foi exceção, e teve de ser ajustada a um novo estilo de vida.

Hoje em dia, são necessários produtos cujo prazo de validade não seja demasiadamente curto e que mantenham as suas características organoléticas durante o máximo tempo possível.

Numa era de alimentação global, sem fronteiras, onde um produto típico de determinado país pode ser consumido em qualquer ponto do planeta, a segurança alimentar é muito importante na alimentação humana, salvaguardando a saúde do homem.

Atualmente existe a necessidade de aumentar a eficiência na produção alimentar, assim como a qualidade dos produtos, devido a um constante crescimento da população mundial, à existência de doenças relacionadas com hábitos alimentares, a uma competição por águas e solos de cultivo, ao consumo de alimentos para fins não alimentares (produção de biocombustível por exemplo), às alterações climáticas, assim como ao desgaste excessivo dos solos [1-4].

Assim, é fundamental um aumento dos conhecimentos sobre as propriedades funcionais dos constituintes alimentares, adotando-se medidas de sustentabilidade de processos e produtos [1].

Na maioria das vezes o alimento pode ser considerado um sistema multi-componente e multi-fase, com misturas complexas entre água, polissacarídeos, proteínas, lípidos entre outros que se encontram em menor quantidade [1].

O amido está presente em muitos dos alimentos consumidos pelo ser humano. Este polissacarídeo encontra-se em quantidades significativas nas raízes, caules, frutos, tubérculos e sementes de várias plantas [5].

Desde a antiguidade, os Egípcios e posteriormente os Romanos utilizaram-no como adesivo (cola). Por sua vez, os Gregos usaram o amido para fins medicinais [6].

O amido para além de essencial à alimentação do ser humano, é de grande importância como matéria-prima para diversas indústrias. São extraídas anualmente 60 milhões de toneladas em todo o mundo, principalmente a partir de cereais, tubérculos e raízes, sendo 60% usado na área alimentar, como por exemplo no pão, maionese, sopas, xaropes de açúcar, produtos derivados de carne, refrigerantes, cerveja, preparados para recém-nascidos, gelados, podendo mesmo ser utilizado como substituto de gordura [1, 6].

Os restantes 40% de amido são utilizados quer na área farmacêutica, (comprimidos, por exemplo), como para fins não alimentares, onde é utilizado para a produção de fertilizantes, na indústria do papel e cartão (melhora a resistência e qualidade de acabamento do produto, e é usado como cola para sacos de papel), indústria têxtil, em fraldas, em perfurações de petróleo (usado para melhorar a viscosidade das lamas de perfuração de poços de petróleo, selando as paredes dos furos, evitando perdas de fluidos), na produção de bioplásticos e em materiais de construção [1, 6].

O amido é essencial na alimentação e contribui com 50% a 70% da energia necessária na dieta humana (fonte direta de glucose) [1].

A resposta glicémica ao consumo excessivo de amido de digestão rápida, pode ser responsável por doenças relacionadas com hábitos alimentares [1]. No entanto, o amido que não é totalmente digerido na parte superior do sistema digestivo e resiste até ao intestino grosso vai funcionar como um pré-biótico, sendo benéfico para a saúde humana [7, 8].

As diferentes propriedades funcionais do amido das várias espécies botânicas permitem a sua utilização em muitas áreas e indústrias. As condições climáticas a que determinada planta está sujeita têm uma influência significativa nas propriedades físico-químicas do amido, podendo representar maiores diferenças no amido do que o facto da proveniência ser de duas espécies diferentes de plantas. Isto por vezes torna-se uma desvantagem para a indústria, pelo facto da matéria-prima poder não ser homogénea [1, 5].

É de enorme importância e interesse para a indústria e alimentação humana, a compreensão de como o processamento e propriedades nutricionais, estão relacionadas com a morfologia do amido e suas interações com outros constituintes [1].

O amido quimicamente modificado é extensivamente utilizado de forma a superar a variabilidade do amido nativo [1]. No entanto, pode-se também recorrer a processamento térmico ou de alta pressão para se obter amido com características diferentes do amido nativo.

Existe também a possibilidade da formação de complexos amido-lípido, que são atualmente utilizados para diversos fins na indústria alimentar, como por exemplo: redução de viscosidade em alguns alimentos com amido, melhorias na estabilidade de ciclos congelação-descongelação, retardar o endurecimento/secagem (*staling*) do pão, substituto de gorduras em alimentos, espessante e estabilizante em alimentos [9, 10].



É também possível recorrer à tecnologia transgénica, alterando processos de biossíntese pela segmentação e manipulação de enzimas específicas, permitindo obter amido com características diferentes para aplicações comerciais específicas [5].

A aplicação da tecnologia de alta pressão a alimentos começou a ser usada com a finalidade de aumento da segurança alimentar, verificando-se também que este processamento poderia ser útil na modificação de propriedades de alimentos. Assim, a aplicação da tecnologia da alta pressão em amido, pode ser vantajosa pela diversificação das características do amido.

Ao longo dos tempos, o estudo das propriedades viscoelásticas do amido tem sido feito com recurso a reómetros. No entanto, neste trabalho vai ser utilizado um sensor acústico, com um cristal de quartzo piezoelétrico, para estudar as propriedades viscoelásticas de suspensões de amido nativo e processadas a alta pressão.



## 2 - Amido



## 2.1 - Amilose e Amilopectina

O amido é composto por dois polímeros de D-glucose, a amilose e a amilopectina, que correspondem a 98-99% do peso seco do grânulo de amido, sendo o restante vestígios de lípidos (até 1% nos amidos de cereais), proteínas, fósforo e outros minerais [11]. O conteúdo dos grânulos em água é cerca de 10%, não estando uniformemente distribuída [1].

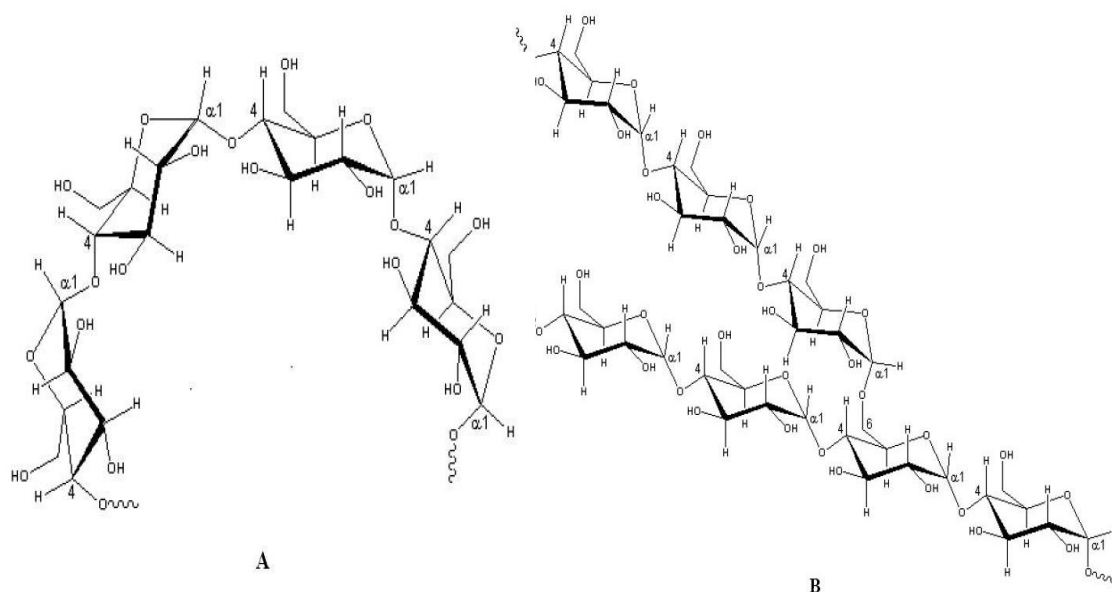


Figura 1 - Estrutura da amilose (A) e da amilopectina (B) [12].

A amilose é um polímero essencialmente linear, composto por unidades de D-glucose em ligação  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 4], onde menos de 0,5% das ligações são  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 6], traduzindo-se esta proporção num baixo grau de ramificação [1]. Apresenta um peso molecular aproximadamente de  $10^5$ - $10^6$  Da, correspondendo a um grau de polimerização (DP) de 1000-10000 unidades de glucose [1, 5]. As moléculas de amilose podem conter 2 a 11 cadeias com 200 a 700 unidades de glucose por cadeia [5].

Devido ao baixo grau de ramificação, a amilose dissolvida tem tendência a formar agregados semicristalinos, dependendo do posicionamento das ramificações na estrutura [1].

A amilopectina é um polímero maior do que a amilose, com peso molecular de  $10^7$ - $10^9$  Da e um grau de polimerização (DP) que pode exceder 1 milhão [1, 5]. É composta por unidades de D-glucose com ligações  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 4], com 5% a 6% da glucose em ligações  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 6], sendo estas últimas responsáveis pelas ramificações [13].

De referir que Lansky et al. [14] propõem a existência de um material intermédio, um terceiro componente no amido, com propriedades diferentes da amilose e amilopectina [12, 14]. Chegou a ser referido que 5% a 7% do amido de milho era material intermédio [12]. No entanto, dificuldade no seu isolamento e purificação trouxeram dificuldades ao seu estudo [13, 15].

A maioria dos amidos têm entre 60% a 90% de amilopectina, existindo no entanto amidos com alto teor de amilose, apresentando apenas 30% de amilopectina, assim como amidos cerosos com 100% amilopectina [1].

## 2.2 - O grânulo de amido

Os grânulos de amido são semicristalinos, variando quer no tamanho (entre 1-110  $\mu\text{m}$  de diâmetro) como também na forma (oval, disco, poligonal, esférica ou irregular) [16]. No interior, existem também variações ao nível de conteúdo, estrutura e organização da amilose e amilopectina, ramificações de amilopectina e grau de cristalinidade [13, 17].

Apesar de não existir uma classificação padrão dos grãos de amido de acordo com o seu tamanho, Lindeboom et al. [17] classificaram-nos da seguinte forma: grandes ( $>25\mu\text{m}$ ), médios ( $10\text{-}25\mu\text{m}$ ), pequenos ( $5\text{-}10\mu\text{m}$ ) e muito pequenos ( $<5\mu\text{m}$ ) [17].

Os grânulos de amido, relativamente ao tamanho, podem apresentar uma distribuição unimodal ou bimodal, sendo esta última encontrada em trigo, cevada e centeio. A caracterização bimodal é feita pela diferenciação do diâmetro dos grânulos, maiores ou menores que  $10\mu\text{m}$ . O diâmetro dos grânulos influencia as propriedades físico-químicas do amido [17].

Os grânulos de amido, quando observados ao microscópio eletrónico de varrimento, podem aparentar-se lisos sem indícios de fissuras [16]. No entanto, Buléon et al. [13] refere que o amido de milho, sorgo e cevada, entre outros, quando analisados por microscopia eletrónica de varrimento, apresentam poros à superfície, cuja quantidade é variável, sendo o amido considerado um material poroso [13].

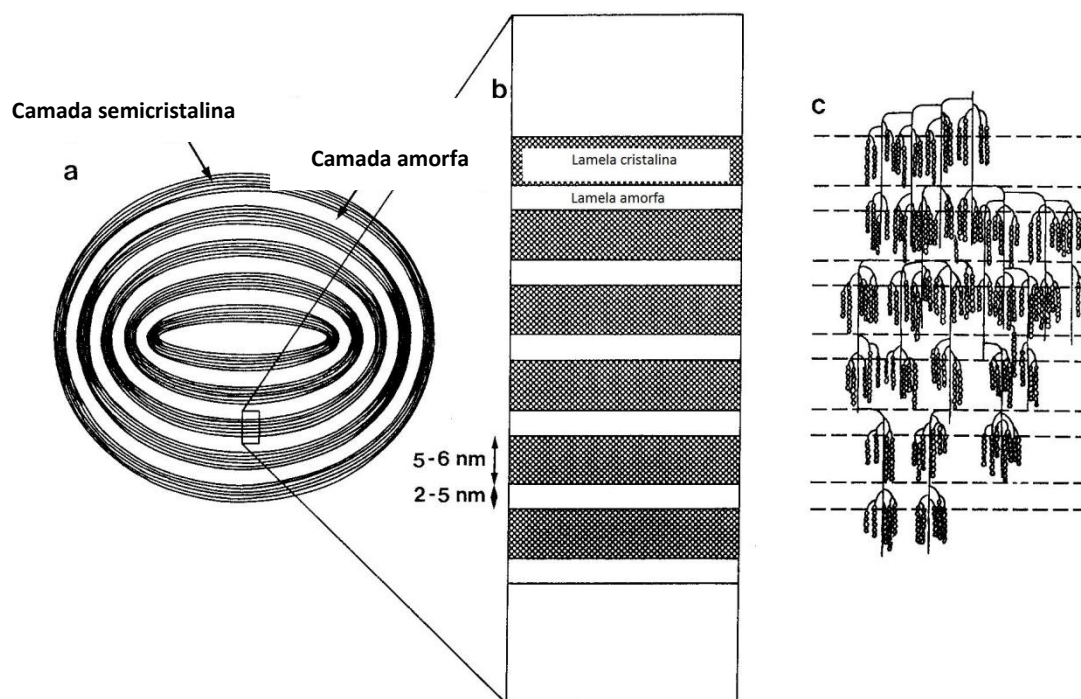


Figura 2 - Representação dos anéis de crescimento no interior do grânulo de amido – camadas semicristalinas e amorfas do grânulo de amido (a), ampliação da camada semicristalina onde se verifica a alternância da lamela cristalina com a amorfa (b), representação das cadeias de amilopectina de acordo com as lamelas cristalinas e amorfas (c). Adaptado ref. [11].

Devido à existência de múltiplas camadas concêntricas, anéis de crescimento, Oates [18] sugere que o material sintetizado na célula vegetal fica depositado na superfície do grânulo, levando a que este aumente de tamanho. A primeira camada de crescimento, que se encontra no centro (hilo), contém muitos terminais redutores, que se expandem para a superfície, levando a que mais resíduos de glucose aumentem as cadeias de amilopectina [18].

Na figura 2 está representado os múltiplos anéis de crescimento que existem num grânulo de amido, cujo diâmetro aumenta do hilo até à superfície [1]. Existem dois tipos de camada, uma camada densa e semicristalina e uma outra amorfa, tendo a primeira uma espessura que varia entre 120 a 400 nm e a segunda tem no mínimo a mesma espessura da primeira. A camada semicristalina é constituída por lamelas cristalinas (5-6 nm) e amorfas (2-5 nm) que se dispõem alternadamente [11].

Hoover [16] refere que as moléculas de amilopectina contêm várias distribuições de cadeias - A, B e C, que diferem no comprimento da cadeia. As cadeias tipo A consideram-se cadeias lineares, sem ramificações, unidas a uma cadeia do tipo B, as cadeias do tipo B

estão ligadas a uma ou mais cadeias do tipo A e/ou B, existindo uma cadeia tipo C que contem o grupo terminal redutor [16].

Por sua vez, Tester et al. [5], apoiam uma caracterização das cadeias de amilopectina de acordo com o tamanho e padrão de ligação. Afirmam que as moléculas de amilopectina se expandem do centro para a periferia dos grânulos de amido, sendo as cadeias mais externas (periféricas) definidas como cadeias-A, estando estas ligadas por ligação  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 6] a cadeias-B, cadeias estas que por sua vez estão ligadas a outras cadeias B, que, dependendo do seu comprimento podem, ser denominadas de B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>, B<sub>3</sub> e B<sub>4</sub>. Por sua vez todas as cadeias estão ligadas a uma cadeia central C, que possui o grupo redutor terminal da cadeia [5].

As cadeias-A e as pequenas cadeias-B (B<sub>1</sub>) associam-se em dupla hélice e formam aglomerados ao longo da amilopectina difundida, formando lamelas cristalinas de alta densidade, que estão intercaladas com lamelas amorfas de baixa densidade. As lamelas amorfas correspondem às regiões das ligações  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 6] da amilopectina e a algumas moléculas de amilose. As cadeias mais compridas de amilopectina atravessam de uma lamela cristalina para outra, atravessando a lamela amorfa, prolongando-se assim pelo grânulo de amido [5].

A distribuição e função da água, que atua como “plastificante” e influencia a estrutura cristalina, ainda não está completamente compreendido [1, 13]. No entanto, as camadas amorfas contêm maior quantidade de água [11].

A relação entre a amilose e amilopectina também ainda não se encontra completamente compreendida. Presume-se que a amilose se encontra separada de certa forma da amilopectina, pelo facto de esta poder ser extraída do grânulo. A localização específica da amilose no grânulo não é exata. No entanto, pode ser encontrada nas camadas menos densas (amorfas) dos anéis de crescimento, e também entre a amilopectina nas camadas semicristalinas, perturbando desta forma o “empacotamento” da amilopectina [11, 18].

A cristalinidade dos grânulos do amido é afetada pelo teor em amilose. As maiores moléculas de amilose estão presentes no centro do grânulo e as de menor tamanho na periferia, podendo assim ser lixiviadas [18].

A maioria dos compostos existentes na superfície do grânulo são proteínas, enzimas, aminoácidos e ácidos nucleicos, e muitos podem ser extraídos sem rompimento



do grânulo. Relativamente a compostos minoritários, os lípidos são a fração mais importante no amido, sendo os triglicerídeos os lípidos que mais se encontram na superfície de amido de milho e trigo [13].

A nível interno do grânulo de amido, os lípidos são os que se encontram em maior quantidade, característica usualmente associada ao amido de cereal [13].

Na maioria dos amidos a fração mineral é desprezável, sendo o fósforo o elemento mais importante, encontrando-se na forma de fosfolípidos no caso de amido de cereal [13].

### 2.3 - Cristalinidade dos grânulos

A região cristalina dos grânulos de amido pode exibir diferentes tipos de padrão de difração de raio-x, sendo possível desta forma indicar a origem botânica do amido [19].

O grau de cristalinidade do amido nativo varia entre 15% para amido com alto teor de amilose e 45-50% para amido ceroso [1].

A maioria dos amidos de cereal exibem um padrão tipo A, enquanto que o amido de tubérculos apresentam um padrão tipo B, existindo também um padrão C, que se encontra normalmente em legumes [5].

As estruturas de dupla hélice nas formas A e B, apesar de semelhantes, apresentam algumas diferenças. No amido tipo A, a estrutura é mais compacta, tendo o tipo B uma estrutura mais aberta com um núcleo hidratado [20]. Existe um padrão tipo C, que se caracteriza por ser um intermédio entre o tipo A e B relativamente à forma compacta que apresenta, sendo considerado uma mistura das estruturas características do tipo A e B [20-22].

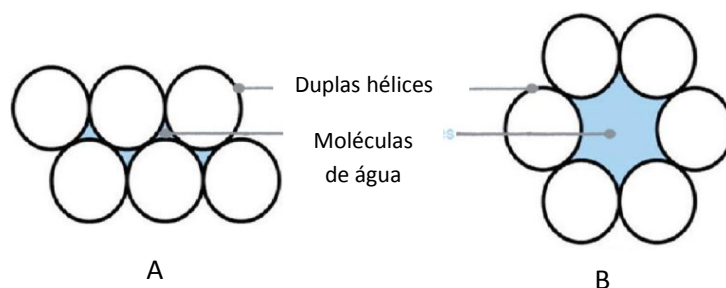


Figura 3 - Representação da disposição das estruturas de dupla hélice de acordo com a cristalinidade tipo A e B. Adaptado ref. [21].

Tester et al. [5] afirmam que o amido com padrão de difração do tipo A é termodinamicamente mais estável e não pode ser convertido em amido do tipo B por aplicação de calor na presença de água. No entanto, alguns investigadores usaram um tratamento térmico para converter o amido do tipo B e C em amido tipo A [5].

De referir que no trabalho de Katopo et al. [23] se refere a possibilidade da passagem de cristalinidade do tipo A para B com utilização de processamento de alta pressão na presença de água [23].

Com aplicação de alta pressão ao amido do tipo B, a água preenche os canais existentes no grânulo estabilizando a estrutura cristalina. No amido do tipo A e por efeito da pressão as estruturas ramificadas tornaram-se mais dispersas, tornando mais flexível a estrutura, permitindo rearranjos das duplas hélices, que por sua vez geram um canal, que permite incluir moléculas de água. Existe desta forma passagem da estrutura cristalina do tipo A para B [23].

Relativamente ao comportamento do amido no processamento de alta pressão, o amido com maior resistência é o que apresenta cristalinidade do tipo B, sendo o do tipo A o mais sensível à aplicação de pressão [24].

Na tabela 1 é possível verificar o tipo de cristalinidade característica de algumas fontes de amido.

**Tabela 1 – Padrão de difração de raio-x (cristalinidade) característico de algumas fontes de amido [21, 24-27].**

Fonte de Amido	Tipo de cristalinidade		
	A	B	C
Milho normal	X [21, 28]		
Milho ceroso	X [28]		
Milho com alto teor em amilose		X[25]	
Trigo	X [21, 24]		
Arroz normal	X [21, 28]		
Arroz Ceroso	X [21, 28]		
Arroz com alto teor em amilose		X [21, 25]	
Mandioca		X [21]	
Batata		X [21, 24]	
Batata doce			X [21]
Ervilha lisa			X [21]
Ervilha rugosa		X [21]	
Tapioca			X [24]
Grão-de-bico			X [26]
Sorgo	X [27]		
Feijão-frade			X [29]

## 2.4 - Complexo amido-lípido

Os lípidos têm um papel relevante nas propriedades do amido, encontrando-se associados aos grânulos, quer à superfície quer no seu interior. Para amido de milho e trigo, os que estão à superfície são na sua maioria triglicerídeos e em menor quantidade, glicolípidos e fosfolípidos (correspondem a restos das membranas dos amiloplastos) [13]. Os lípidos que se encontram no interior do grânulo são predominantemente lípidos monoacilados (ácidos gordos livres – FFA e lisofosfolípidos - LPL) [13].

Ambos os tipos de lípidos podem estar presentes no estado livre, ligados por ligações iónicas ou de hidrogénio aos grupos hidroxilo, ou ligado em forma de complexos de inclusão de amilose [1].

Os complexos formados entre amilose e lípidos, modificam as propriedades do amido em questão. Estas modificações nas propriedades/funcionalidades do amido são de extrema importância para várias indústrias [1, 30, 31].

Devido ao elevado número de ramificações na amilopectina, a capacidade de ligação com lípidos é menor do que com a amilose. Por outro lado é também possível afirmar que o grau de cristalinidade e estabilidade térmica dos complexos amido-lípido aumenta com o aumento do comprimento das cadeias de amilose [10, 32].

Estudos efetuados permitem afirmar que o grupo hidrofóbico da cadeia do ácido gordo se encontra dentro da hélice de amilose, considerando que os grupos polares dos ácidos gordos e monoacilglicerídeos são demasiado volumosos para estarem dentro da hélice da amilose. Assim, este modelo sugere que a amilose tem inserida em cada extremidade da hélice, a parte alifática dos lípidos [30, 31, 33, 34].

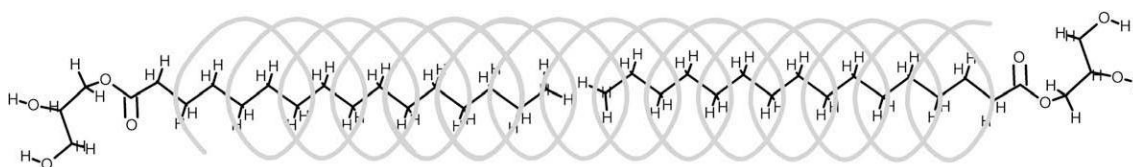


Figura 4 – Representação esquemática do complexo de amilose com duas moléculas de palmitato de glicerol [1].

O complexo amido-lípido pode ser formado durante a gelatinização do amido, embora também ocorra naturalmente na natureza em alguns amidos [10].

Entre alguns exemplos de mudança de propriedades e funcionalidades, conseguidas pela interação entre lípidos e amido tem-se a redução de solubilidade do amido em água, aumento da viscosidade final das pastas de amido, diminuição da capacidade de inchamento dos grânulos de amido, aumento da temperatura de gelatinização, redução da rigidez do gel, retardamento da retrogradação e redução da probabilidade de hidrólise enzimática [9, 10, 30, 31, 35-37].

## 2.5 - Digestão enzimática e Amido Resistente

A despolimerização do amido é inicialmente efetuada por  $\alpha$ -amilases, que clivam as ligações  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 4], sendo as amiloglicosidases e isoamilases responsáveis pela clivagem das ligações  $\alpha$  [1 $\rightarrow$ 6]. As características do grânulo de amido influenciam a suscetibilidade do ataque das  $\alpha$ -amilases. O amido com cristalinidade do tipo A tende a ser mais resistente à digestão enzimática que o amido do tipo B [1].

Presumivelmente, a água e enzimas acedem primeiro às regiões amorfas do grânulo, sendo estas regiões atacadas mais rapidamente do que as regiões cristalinas. De referir que o amido ceroso é atacado mais rapidamente que o amido com grande quantidade de amilose [1, 19].

A definição de amido resistente foi associada durante muito tempo à digestão incompleta (*in vitro*) de amido de alimentos cozinhados e posteriormente arrefecidos. Na atualidade, a denominação de amido resistente engloba todo o amido e produtos resultantes da degradação do amido que resistem à digestão no intestino delgado, seguindo até ao intestino grosso [8].

O amido resistente acaba assim por ser determinado pela digestão que ocorre até, e no, intestino delgado, sendo esta digestão influenciada por vários fatores, entre os quais: a estrutura do amido, a presença de outros compostos alimentares, o processo de cozimento, o processamento industrial, e a própria mastigação [8].

O amido resistente foi inicialmente dividido em três grupos principais, sendo posteriormente adicionado um quarto. O grupo RS<sub>1</sub> corresponde ao amido fisicamente inacessível (por se encontrar aprisionado dentro das células da planta ou dentro da matriz do alimento); no grupo RS<sub>2</sub> estão inseridos os grânulos resistentes, por má gelatinização ou

lenta hidrólise pelas  $\alpha$ -amilases; o grupo RS<sub>3</sub> corresponde ao amido retrogradado (amido gelatinizado com posterior arrefecimento) e encontra-se por exemplo em “*cornflakes*”, pão e batata cozida; por último o grupo RS<sub>4</sub> é onde se insere o amido quimicamente modificado [8, 38, 39].

De forma a compreender como o amido resistente é importante para o ser humano, devem ser referidas algumas etapas importantes da digestão. Grandes polissacarídeos (amido resistente, celulose, hemicelulose e pectinas), alguns oligossacarídeos, açúcares e álcoois, não são absorvidos pelo homem. Todos estes compostos acabam por ser fermentados pela microflora do intestino, formando ácidos gordos de cadeia curta. A utilização de péptidos e proteínas pela microflora (putrefacção) também leva à formação de ácidos gordos de cadeia curta, ocorrendo contudo a formação de várias substâncias tóxicas nocivas para o ser humano [7].

A partir destas fermentações obtém-se principalmente butirato, acetato e propionato, podendo ter estes dois últimos, um importante papel como moduladores do metabolismo da glucose. A absorção destes, pode resultar numa melhoria da sensibilidade à insulina. Assim, considera-se que alimentos com elevadas quantidades de hidratos de carbono não digeríveis, têm um baixo índice glicémico [7].

A microflora existente no cólon é importante na síntese de vitaminas, absorção de cálcio, magnésio e ferro. De referir que a absorção de iões no ceco é melhorada pela fermentação de hidratos de carbono [7]. Também se encontram na literatura referências a que uma dieta com alto conteúdo de amido resistente, pode reduzir o risco de cancro do cólon, devido à produção de grandes quantidades de butirato. Com todos estes benefícios para a saúde, houve necessidade de desenvolver processos para novos produtos com maior quantidade de amido resistente [40].

## 2.6 - Propriedades funcionais do amido

Muitos dos produtos alimentares que contêm amido, sofrem vários processos (térmicos e/ou físicos), antes de chegarem ao consumidor, que acabam por alterar de alguma forma as propriedades do mesmo.

Quando o amido é sujeito a aquecimento na presença de suficiente quantidade de água, os grânulos incham, devido à entrada de água para o seu interior. Ocorre também saída de amilose juntamente com água, especialmente quando o grânulo não é perfeito [41].

A temperaturas mais elevadas a amilopectina começa a fundir (destruição das estruturas de dupla hélice), o que permite a libertação de uma importante quantidade de amilose que se encontrava aprisionada entre as lamelas cristalinas e uma pequena parte que se encontrava na amilopectina cristalizada. Neste fenómeno, quanto maior a quantidade de água, menor a temperatura de fusão da amilopectina [41].

A gelatinização é geralmente vista como o conjunto de processos que ocorrem durante o aquecimento do amido na presença de água: inchamento de grânulos, saída de amilose, fusão da amilopectina, destruição da ordem molecular, perda de birrefringência, perda de cristalinidade, desenvolvimento de viscosidade e formação de gel ou massa tipo pasta [41, 42].

No entanto, para alguns investigadores a gelatinização compreende apenas os seguintes processos: inchamento do grânulo de amido, saída de amilose do seu interior, perda de birrefringência, perda de cristalinidade e fusão da amilopectina (destruição de estruturas de dupla hélice) [16]. Existe assim um outro fenómeno, *pasting*, que surge logo após a gelatinização, onde ocorre mais inchamento do grânulo, saída de mais componentes do seu interior, aumento de viscosidade e rutura total do grânulo de amido [11, 42].

A viscosidade máxima atingida durante o “*pasting*” corresponde ao momento em que os grânulos se encontram inchados ao máximo mas continuam intactos [1]. No trabalho de Vallons et al. [43] verificou-se que a rutura completa dos grânulos inchados tem como consequência uma diminuição da viscosidade [43]. Para a rutura total dos grânulos e formação de uma pasta concorre o cisalhamento, caso contrário os grânulos não são totalmente solubilizados até uma temperatura que pode atingir os 120 °C [42].

A pasta de amido caracteriza-se por uma massa viscosa, com uma fase contínua de amilose e/ou amilopectina solubilizada e uma fase descontínua de restos de grânulos (grânulos fantasma e fragmentos) [42].

Os termos gelatinização e “*pasting*” são muitas vezes usados indistintamente. No entanto, o primeiro corresponde sobretudo a destruição da ordem molecular assistindo-se à perda de birrefringência e cristalinidade e ocorre sempre primeiro do que o “*pasting*”, que se refere à destruição de ordem molecular evidenciada pelo desenvolvimento de viscosidade [42].

No período de arrefecimento, verifica-se um aumento da viscosidade [12]. No final existe um gel de amido, que posteriormente com o armazenamento sofre retrogradação [44].

A retrogradação consiste na formação de uma nova estrutura ordenada. Este fenómeno envolve dois passos: 1) gelificação e cristalização da amilose e 2) nova cristalização da amilopectina. Durante a retrogradação a amilose associa-se em dupla hélice, enquanto que a cristalização da amilopectina se dá pela associação das ramificações curtas mais externas [11, 16].

A figura 5 representa esquematicamente os processos que ocorrem no amido durante o aquecimento e arrefecimento na presença de água.

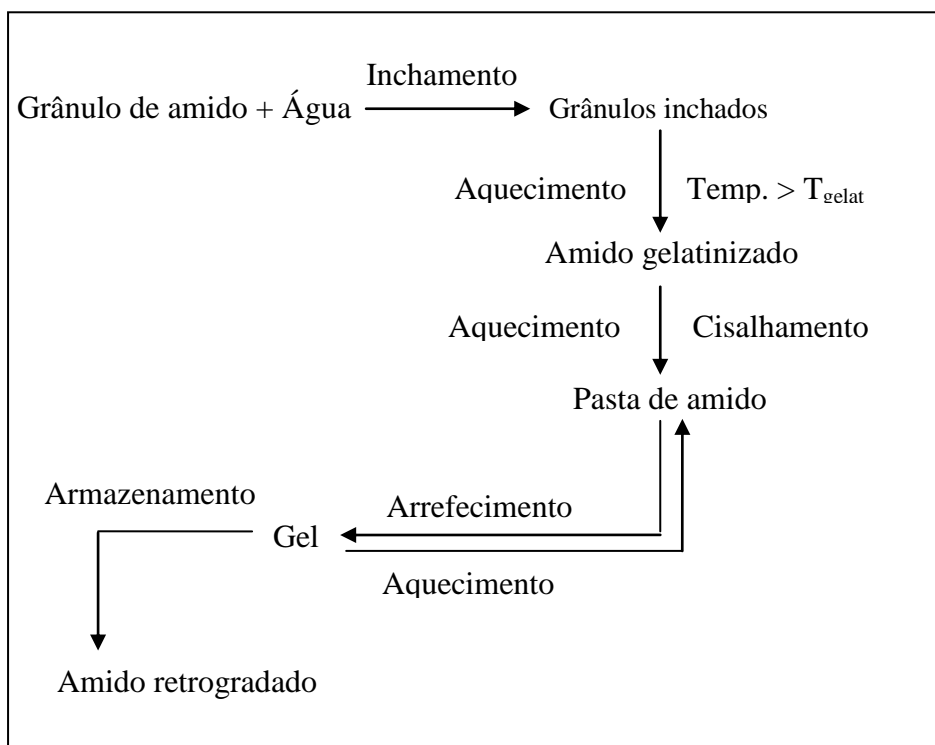


Figura 5 - Esquema dos processos que ocorrem no amido durante aquecimento, arrefecimento e armazenamento. Adaptado ref. [44].

As técnicas normalmente utilizadas no estudo da gelatinização não conseguem separar os mecanismos de gelatinização e gelificação do amido [41].

No processo de gelatinização existe uma transição de um estado ordenado para um desordenado, ocorrendo perda de cristalinidade e perda de birrefringência. A perda de birrefringência é utilizada por vezes para mostrar o grau de gelatinização, embora esta definição tenha limitações, sendo por vezes difícil de distinguir deste modo o amido gelatinizado, do não gelatinizado [28].

O conteúdo em amilose parece estar relacionado com a temperatura de gelatinização. Amido com maior teor de amilose, requer mais energia durante o processo de gelatinização [25, 45].

A gelatinização pode também ser induzida por um processo de alta pressão, sem aplicação de qualquer tratamento térmico. Na secção “Processamentos de amido a alta pressão” (4.2) deste trabalho é explicado este fenómeno.

As características de solubilidade e inchamento dos grânulos de amido dependem de vários fatores: razão amilose:amilopectina, características inerentes à amilose e amilopectina (peso e distribuição), grau de ramificação, comprimento das ramificações e conformação do grão de amido. Segundo Lindeboom et al. [17] os grânulos de amido do tipo B estão associados a maiores taxas de absorção de água, hidratação e inchamento, devido possivelmente a uma maior proporção de zonas amorfas, que estão mais acessíveis à água [16, 17].

De referir que os complexos amilose-lípido restringem a solubilidade e inchamento [16, 17].

O grão de amido semicristalino, à passagem pela temperatura de transição vítrea ( $T_g$ ), durante o aquecimento da amostra, leva à alteração de um estado rígido vítreo das regiões amorfas para um estado móvel tipo borracha [11, 46].

É importante referir mais dois termos muito utilizados no processamento do amido, *annealing* e *heat-moisture treatment*, os dois são definidos como um tratamento físico que envolve a incubação dos grânulos de amido, durante um certo período de tempo, a uma determinada temperatura superior a  $T_g$  e inferior à temperatura de gelatinização. A diferença entre estes dois tratamentos é a quantidade de água em que o amido é incubado, *annealing* para excesso de água ou quantidade intermédia de água ( $\geq 40\%$  w/w), *heat-moisture treatment* referido para pouca quantidade de água ( $\leq 35\%$  w/w) [11].



### 3 - Técnicas usadas no estudo do amido



### 3.1 - Introdução

Têm sido usadas diversas técnicas para analisar as características e propriedades do amido. A calorimetria diferencial de varrimento (DSC), análise de difração de raio-x, reologia, algumas espectroscopias (infravermelho por transformada de Fourier - FTIR e ressonância magnética nuclear – RMN, por exemplo), diversas microscopias, *kits* enzimáticos, são alguns dos recursos que estão ao dispor do investigador.

Apesar do processo de gelatinização já ter sido estudado com recurso à reologia, este método não é suficiente para uma caracterização completa da gelatinização, sendo necessário o recurso a outras técnicas para completar informação (por exemplo a nível molecular) [43, 47].

A utilização de microscopia de luz polarizada, fornece informações importantes relativamente à transição do estado ordenado para um estado desordenado no grânulo de amido. No entanto, esta informação quando é conjugada com outras, provenientes das restantes técnicas, melhora a compreensão do processo de gelatinização [28, 48].

As técnicas calorimétricas são importantes para a caracterização da gelatinização, não sendo no entanto adequadas para uma monitorização em contínuo do processo, uma vez que esta técnica incide nas mudanças de fase [47, 49].

A conjugação das informações obtidas através das diversas técnicas é importante para a compreensão do processo de gelatinização.

Já foram utilizados sensores acústicos no estudo da gelificação de polímeros [47], nomeadamente para detetar mudanças na viscosidade, determinação do módulo de cisalhamento e degradação do próprio polímero [50-52]. Não foi encontrada na literatura qualquer referência de utilização de sensores acústicos no estudo do processo de gelatinização do amido. No entanto pensa-se que estes permitirão uma análise das características viscoelásticas do amido ao mesmo tempo que é aplicado um tratamento térmico, como irá ser provado neste trabalho.

### 3.2 - Microscopia eletrônica de varrimento (SEM)

Através deste método é possível obter imagens definidas do grânulo de amido, com uma excelente representação da sua superfície, com uma aparência tridimensional da amostra.

No SEM uma amostra previamente preparada, de forma a adquirir capacidade condutora elétrica, é varrida por um feixe de elétrons. Assim que esses elétrons atingem a amostra, forma-se uma variedade de sinais, incluindo elétrons secundários de baixa energia das camadas mais elevadas na amostra [53].

Alguns desses elétrons secundários são recolhidos, processados e eventualmente traduzidos como uma série de píxeis num monitor [53].

O brilho do pixel é diretamente proporcional ao número de elétrons secundários gerados na superfície do espécime. Uma vez que o feixe de elétrons varre rapidamente a amostra, os numerosos pontos misturam-se numa imagem de tom contínuo composto por muitos níveis de densidade ou tons de cinzento. A tonalidade é similar a uma fotografia a preto e branco, onde as áreas claras e escuras dão a noção de profundidade [53].

Com esta técnica é possível determinar o tamanho e forma dos grânulos de amido [16]. Quando aplicado um processamento de alta pressão, com posterior liofilização da amostra, esta técnica permite também verificar se a estrutura granular manteve a sua integridade [45].

### 3.3 - Microscopia de luz polarizada

A luz polarizada, ao contrário da luz natural, é composta apenas por raios que vibram numa única direção/plano [54].

São utilizados dois filtros polarizadores, o polarizador e o analisador, estando o primeiro mais próximo da fonte de iluminação (normalmente em conjunto com o condensador) e o segundo mais próximo do olho do investigador, encontrando-se a amostra a meio destes dois filtros [54].

O cruzamento dos polarizadores bloqueia por completo a passagem do raio de luz, no entanto a presença de uma amostra anisotrópica vai permitir a passagem de luz [54].

Na birrefringência cada raio de luz é dividido em dois, um passa em linha reta pelo objeto (raio ordinário) e o segundo sofre um deslocamento (raio extraordinário). Se o raio

extraordinário tiver maior índice refrativo que o raio ordinário, a substância é positivamente birrefringente, por sua vez, se o raio ordinário tiver maior índice refrativo, a substância é negativamente birrefringente. Os dois raios produzidos diferem também na direção de vibração, vibrando perpendicularmente [54].

Uma substância que se comporta desta forma é denominada de anisotrópica. No entanto, se os raios ordinário e extraordinário viajarem em conjunto relativamente a uma certa direção (chamado eixo ótico), não se verifica a dupla refração (birrefringência) [54].

Em gases, líquidos e substâncias amorfas, onde as moléculas estão distribuídas aleatoriamente, o raio de luz que penetra a amostra é atrasado, mas a velocidade (índice refrativo) é a mesma para todas direções de propagação (isotropia) [54].

O processo de gelatinização ocorre durante um determinado intervalo de temperatura, onde geralmente os grânulos maiores gelatinizam primeiro e os mais pequenos em ultimo lugar [48].

Quando a gelatinização do amido é estudada em microscopia de luz polarizada são obtidas as seguintes informações: temperatura de iniciação ( $T_{onset}$ ), caracterizado pela perda de cruz de malta, que corresponde ao momento em que o primeiro grânulo perde a birrefringência, temperatura intermédia e a temperatura final ( $T_{endset}$ ), que corresponde à temperatura em que o ultimo grânulo perde a birrefringência, não existindo nenhuma cruz de malta na amostra [48]. O amido durante o aquecimento passa de um estado ordenado para um estado desordenado durante a gelatinização [28].

A ordem molecular que existe no amido nativo evidenciada pela birrefringência ótica (presença de uma cruz de malta) é também verificada em amidos granulares tratados por ácidos e cadeias curtas de amilose cristalizadas [55].

Apesar da birrefringência implicar um elevado grau de orientação molecular no grânulo, a cristalinidade não é um pré-requisito de birrefringência [55]. Não se devem misturar os termos cristalinidade e birrefringência, existem casos em que há uma boa ordenação das partículas mas não existe cristalinidade. Um destes casos é a celulose presente numa folha de papel, é semicristalina e os cristais em si mesmo são birrefringentes (ordenados), no entanto estão orientados aleatoriamente na folha de papel e como um todo não há birrefringência [56].

O centro da cruz de malta é considerado o ponto original de crescimento do grânulo (hilo). O grânulo de amido apresenta uma orientação radial [12].

Os grânulos de amido são considerados cristais esféricos distorcidos, pela presença da cruz de malta característica. O sinal de birrefringência positivo relativamente ao raio do cristal esférico, teoricamente indica orientação radial das cadeias do polímero. Para grânulos não esféricos, é mais correto afirmar que a orientação é perpendicular aos anéis de crescimento e à superfície do grânulo [13].

A intensidade de birrefringência depende da forma e da orientação dos grânulos em relação ao feixe de luz [13].

### 3.4 - Calorimetria diferencial de varrimento (DSC)

O DSC é uma técnica utilizada por várias indústrias (alimentar e farmacêutica por exemplo), para determinar transições vítreas, cristalização, mudanças de fase, fusões, e estabilidade oxidativa [57]. O DSC é uma das ferramentas mais utilizadas para o estudo da gelatinização térmica do amido [49].

O fluxo de calor é medido como a energia necessária para manter próximo de zero a diferença de temperatura entre a amostra e um material de referência inerte, quando ambos são sujeitos a idêntico tratamento (igual velocidade de aquecimento) [57]. O DSC regista assim a energia necessária para manter uma dada taxa de variação de temperatura [49].

Uma vez que isto acontece a uma pressão relativamente constante, o total de calor (energia) transferido, obtido pela medição das áreas dos picos nos gráficos de DSC, é diretamente proporcional à variação de entalpia ( $\Delta H$ ) da amostra [57, 58].

Quando o amido é aquecido em excesso de água, um pico endotérmico surge. A área por baixo da curva corresponde à medida de energia ( $\Delta H$ ) necessária para a transição de um estado ordenado para um estado desordenado (por exemplo, para a fusão da área cristalina) e reflete a perda de ordem molecular (dupla-hélice) [11, 56, 59].

Associa-se assim  $\Delta H$  da transição à quantidade de ordem cristalina (ou estrutura de dupla-hélice) do amido [60]. Cooke et al. [61] verificaram no seu estudo que a entalpia de gelatinização reflete principalmente a perda de duplas hélices [61].

Apesar de não existir consenso na interpretação dos resultados do DSC e dos eventos que ocorrem durante a gelatinização, pode encontrar-se na literatura [48] uma

referência do papel da água como plastificante para o amido. O efeito da melhoria da mobilidade verifica-se primeiro nas regiões amorfas, que se encontram num estado vítreo (sólido mecânico capaz de suportar o seu próprio peso contra correntes) e não cristalino. Quando os grânulos de amido são aquecidos na presença mínima de 60% de água e a temperatura de transição vítrea é atingida, as regiões amorfas plastificadas sofrem uma transição de fase vítrea para borracha (líquido sobrearrefecido que é capaz de exibir corrente viscosa). No entanto, o pico da energia absorvida para esta transição não é normalmente visível no DSC, devido à fusão das regiões cristalinas que se segue logo após a transição vítrea [48].

Foi provado que a temperatura inicial obtida para o amido nativo é controlada indiretamente pelas regiões amorfas circundantes do grânulo [59].

Na análise do amido por DSC obtém-se a temperatura de gelatinização (temperatura do ponto médio da curva de transição do DSC ou temperatura onde metade dos grânulos de amido perderam a birrefringência), temperatura inicial (que corresponde à temperatura da interceção da linha base com a tangente da primeira metade do pico de gelatinização do DSC ou à temperatura onde se inicia a perda de birrefringência), temperatura final (corresponde à temperatura da interceção da linha base com a tangente da segunda metade do pico de gelatinização do DSC ou à temperatura onde 90% dos grânulos de amido perderam a birrefringência) [49].

As temperaturas obtidas no DSC, especialmente a temperatura de gelatinização, são características da origem biológica do amido e reflete a sua estrutura interna [49].

O ponto final da perda de birrefringência e o final do pico do DSC não são bem os mesmos uma vez que existe um considerável atraso no DSC, no entanto ambos se correlacionam bem [56].

### 3.5 - Sensor acústico

A utilização de ondas de cisalhamento ultrassônicas, permite analisar as propriedades viscoelásticas de líquidos e géis a altas frequências, complementando a reologia dinâmica de baixa frequência. A expansão das medições reológicas para a gama dos MHz permite a análise das contribuições dos processos e interações para a viscoelasticidade dos géis, com tempos característicos de  $10^{-7}$ s ou inferiores [62].

Esta expansão permite uma compreensão do mecanismo molecular na formação de uma rede macroscópica de gel. A baixa amplitude dos deslocamentos mecânicos nas ondas ultrassônicas são ideais por permitirem uma caracterização não destrutiva de líquidos e géis [62].

A utilização das ondas ultrassônicas em líquidos e géis não muito fortes é limitada devido à elevada atenuação das ondas de cisalhamento nestes sistemas. Como alternativa pode ser utilizado um sensor acústico, recorrendo a cristais de quartzo piezoelétricos [62].

A reologia tradicional, quando aplicada a estes sistemas de géis e líquidos deve limitar as deformações, o que pode implicar que estas análises estejam frequentemente abaixo dos limites de exatidão dos instrumentos reológicos convencionais [63].

A aplicação de sensores acústicos para medir os parâmetros viscoelásticos de géis fracos em frequências de MHz, permite obter informação em escalas de tempo entre  $10^{-7}$  e  $10^{-9}$ s. Os deslocamentos das deformações de cisalhamento geradas por esta técnica são extremamente pequenos, na ordem de Angströms, e a tensão de cisalhamento aproximadamente de  $10^{-3}$ , que corresponde aos limites mais baixos da reologia dinâmica clássica. Para além destas vantagens, há a referir que são apenas necessários pequenos volumes, que podem chegar no limite a 0,1 ml [63].

Através deste método é possível a monitorização da viscoelasticidade em tempo real com perturbação mínima para o material [64].

Assim, os sensores acústicos que são geralmente vistos como sensores de massa, quando estão em contacto com um meio líquido, vêm a sua frequência mudar drasticamente com as propriedades do mesmo. O movimento de cisalhamento na superfície gera movimento no líquido perto da superfície. A oscilação da superfície gera assim um fluxo laminar plano no líquido, que causa uma diminuição da frequência proporcional a  $(\rho\eta)^{1/2}$  onde  $\rho$  corresponde à densidade do líquido e  $\eta$  à viscosidade [65-67].



A equação 1 representa o modelo de Kanazawa e Gordon para a frequência dos cristais em contacto com um líquido [68].

$$\Delta F = -f_q^{3/2} \left( \frac{\rho_L \eta_L}{\pi \mu_q \rho_q} \right)^{1/2} \quad (1)$$

Na equação 1,  $\rho_q$  corresponde à densidade do quartzo ( $\text{g/cm}^3$ ),  $\mu_q$  ao módulo de cisalhamento ( $\text{N/m}^2$ ),  $f_q$  à frequência de ressonância (MHz),  $\eta_L$  à viscosidade do líquido ( $\text{g/(cm.s)}^{-1}$ ) e  $\rho_L$  à densidade do líquido ( $\text{g/cm}^3$ ) [68].

Há ainda outros parâmetros que fazem variar a frequência de oscilação do cristal piezoelétrico, como a condutividade, polaridade, temperatura, estrutura da interface sólido/solução, constante dielétrica, extensão da área do cristal em contacto com a solução e rugosidade da superfície [67-69].

No trabalho desenvolvido por Veríssimo et al. [47] foi realizado um estudo sobre a gelificação termicamente reversível de HPMC (hidroxipropilmetilcelulose) [47].



## 4 - Alta Pressão



## 4.1 - Introdução

A história da preservação dos alimentos é longa e sofreu uma enorme evolução. A desidratação, defumação, salga, refrigeração e congelação, apertização, pasteurização, adição de conservantes, irradiação, alta pressão, são alguns dos métodos que têm vindo a ser usados ao longo dos tempos.

O processamento térmico foi um importante marco na preservação do alimento. No entanto, este tratamento implica de alguma forma mudanças nutricionais, funcionais e organoléticas do produto.

Nos dias de hoje tem-se assistido ao desenvolvimento de novas técnicas numa perspetiva de melhorar a segurança dos produtos alimentares, mantendo as suas qualidades nutricionais e organoléticas originais, com o menor processamento possível. A alta pressão é um método privilegiado para obter estes fins [24, 70, 71].

O início da aplicação da alta pressão em produtos alimentares começou com a redução significativa de bactérias no leite após tratamento a 680 MPa durante 10 minutos (1899), seguindo-se a coagulação da albumina de ovo (1914) [23, 72]. Outras aplicações se seguiram e hoje em dia esta técnica pode ser aplicada a vários produtos com várias finalidades, como a inativação microbiana de produtos não processados (ex: vegetais, carne, leite, frutas e marisco), a redução microbiana em produtos processados e embalados (charcutaria e produtos pronto-a-comer), a inativação enzimática (principalmente em produtos derivados de frutas e vegetais), modificação da textura (carne), esterilização (utilização de pressão mais temperatura, ex: produtos pouco ácidos), redução do tempo de coagulação na produção de queijo e maturação (*cheddar* e *mozzarella*), realce da cor verde (ex: espinafre e feijão verde) e redução do tamanho dos “glóbulos” de gordura (iogurte, leite e queijo) [72].

A perda de alguma cor em alguns tipos de carne, melhoria da textura da carne e melhoria das características do iogurte, podem ser referidas como exemplo de modificações resultantes da aplicação de alta pressão [72].

Assim, e para além de todos estes benefícios, o processamento por alta pressão pode ser utilizado para desenvolvimento de novas texturas, sabores e propriedades físicas, levando ao desenvolvimento de novos produtos [70-73].

Uma das vantagens do tratamento por alta pressão é o facto da pressão ser transmitida a todo o produto de forma instantânea e uniforme, reduzindo assim os pontos em que não há processamento, ou pontos em que existe processamento em demasia. Este processo, independente da forma e volume do alimento, não necessita de mais energia para manter o tratamento depois da pressão desejada ser atingida [23, 70].

O processamento por alta pressão pode ser apelidado de amigo do ambiente, uma vez que os gastos de energia e de água são menores comparando com outro tipo de processamento, como o caso do térmico [70].

A aplicação de alta pressão na indústria alimentar é normalmente efetuada entre os 300 e os 1000 MPa durante 2 a 30 minutos. Nos alimentos podem-se encontrar bactérias vegetativas, leveduras, bolores e esporos de bactérias, sendo os três primeiros sensíveis à alta pressão e portanto inativados. Para o caso dos esporos de bactérias, que são resistentes à alta pressão, a sua germinação é inativada pelo baixo pH nos alimentos ácidos, no entanto, para os restantes alimentos existe necessidade de maior cuidado na sua inativação [70]. Quando o tratamento a alta pressão, por si só, não é capaz de inativar os microrganismos, pode ser utilizado juntamente com aplicação de temperaturas suaves [72].

É necessário ressaltar que a aplicação de pulsos de pressão muito elevada (690 e 1700 MPa) em conjunto com temperaturas elevadas (60 e 90 °C) é suficiente para inativar esporos em alimentos pouco ácidos (carne, marisco, vegetais, ovos, leite entre outros) [72].

Em 2009 a FDA (*Food and Drug Administration*) aprovou o uso conjunto de pressão e temperatura para a esterilização de alimentos, tendo em conta o crescimento de esporos, técnica conhecida como PATS (*pressure-assisted thermal sterilization*). No entanto a área de inativação microbiana, principalmente no que se refere aos esporos, necessita ainda de continuar a ser estudada [72].

Existe também a possibilidade de utilização desta tecnologia em conjunto com outros métodos de preservação, como é o caso da utilização de CO<sub>2</sub>, antimicrobianos naturais e aditivos alimentares [72].

Existe a possibilidade de aplicação de indicadores de controlo no processamento a alta pressão de forma a avaliar o tratamento que está a ser aplicado, assegurando qualidade e segurança [24, 70].

No processamento térmico o impacto do processo de aquecimento é quantificado pela aplicação de TTI's (*time, temperature integrators*), que podem ser definidos como

componentes intrínsecos ou extrínsecos, sensíveis ao calor, que permitem a medição direta, quantificando o impacto do tratamento. O mesmo conceito é aplicado ao processamento por alta pressão, sendo os indicadores de controlo denominados por PTTI's (*pressure, time, temperature integrators*), fazendo a monitorização de não uniformidades durante o processamento, PTTI's enzimáticos têm sido aplicados com sucesso [24, 70, 71].

O trabalho de Bauer et al. [24] tinha como objetivo desenvolver a utilização de amido como um PTTI, recorrendo ao fenómeno de gelatinização (induzida por pressão) [24].

## 4.2 - Processamentos de amido a alta pressão

Normalmente o processo de gelatinização no amido é realizado recorrendo à aplicação de um tratamento térmico. No entanto, a alta pressão por si só, pode provocar um processo de destruição da estrutura granular do amido.

O tratamento de amido a alta pressão, induz alterações nos grânulos de amido diferentes das observadas no tratamento térmico. O próprio mecanismo de gelatinização, pastas e géis de amido obtidos por gelatinização a alta pressão apresentam propriedades diferentes. [45, 74].

No ano de 1982, verificou-se pela primeira vez ser possível conseguir a gelatinização do amido através da aplicação de alta pressão à temperatura ambiente, sendo a pressão a que ocorria a gelatinização dependente do tipo de amido que se utilizava. Desde então tem-se verificado que o amido com cristalinidade do tipo B é mais resistente à pressão do que o amido do tipo A e C, sendo o do tipo A o mais sensível à pressão [24, 45].

O amido com cristalinidade do tipo A, na presença de água, pode ser transformado em tipo B com aplicação de um processo de alta pressão [23].

Recorrendo a um tratamento de alta pressão para gelatinizar o amido, são diversos os parâmetros que influenciam o processo, e consequentemente as características finais do amido, entre eles encontra-se o conteúdo em água, a pressão, a temperatura, o tempo de aplicação e mesmo o próprio amido [24].

Grânulos de amido de milho ceroso, tendem a desintegrar-se quando sujeitos à pressão, enquanto que o amido de milho com alto teor em amilose mantém a sua estrutura

nativa até 900 MPa. Amido de batata e cevada, com quantidades médias de amilose, apresentam inchamento de grânulos quando são pressurizados mas não se desintegram [74]. Uma possível explicação para o facto de os grânulos de amido sob pressão se manterem intactos ou serem apenas parcialmente afetados, com fraca ou nenhuma libertação de amilose, está na existência de amilose que estabiliza a estrutura cristalina, não existindo fusão da amilopectina [25, 28].

Relativamente ao processo de retrogradação dos géis de amido, obtidos por processamento a alta pressão, alguns investigadores explicam a diferença dos géis obtidos por tratamento térmico, pela pouca amilose libertada com a pressurização. Estudos efetuados mostraram que a retrogradação de amido gelatinizado por pressão é mais lenta que no amido gelatinizado por aplicação de calor. O gel obtido pela retrogradação do amido de trigo, após gelatinização por pressão, é menos sensível ao passar do tempo e às condições de armazenamento [40, 74].

Vários são os trabalhos encontrados na literatura sobre o comportamento do amido quando sujeito a processamento de alta pressão. De seguida serão referidas as principais conclusões de alguns desses trabalhos.

No trabalho de Bauer et al. [24] utilizaram-se três tipos de amido: amido de trigo (cristalinidade tipo A), batata (cristalinidade tipo B) e tapioca (cristalinidade tipo C) [24]. O grau de gelatinização de todos estes amidos aumentou com o aumento da pressão a uma dada temperatura, assim como quanto maior era a temperatura a que era aplicada uma determinada pressão, menor era a pressão necessária para que ocorresse a gelatinização. Relativamente ao tempo de tratamento com alta pressão, verificou-se que a pressão e temperatura constante, o grau de gelatinização aumentou durante a primeira hora e que a partir desse momento o amido de batata pouco se alterou, enquanto que no amido de tapioca e de trigo o grau de gelatinização continuou a aumentar embora de forma muito reduzida [24].

Relativamente à resistência à pressão, o amido do tipo B foi o que mostrou maior resistência, tal como esperado [24].

O trabalho de Oh et al. [28] chega às mesmas conclusões já referidas, afirmando que diferentes conjugações dos fatores temperatura / pressão aplicada / duração do processamento, podem resultar no mesmo grau de gelatinização [28].



Noutro trabalho também desenvolvido por Oh et al. [75] é confirmada a maior resistência a processos de alta pressão do amido de batata (tipo B), comparando com outros amidos de outros tipos de padrão de difração de raio-x [75].

Na investigação de Rubens et al. [76] foram realizados estudos utilizando espectroscopia de infravermelhos com transformadas de Fourier (FTIR), tendo sido tirada a mesma conclusão relativamente à maior resistência do amido do tipo B à alta pressão [76].

Em estudos com amido de cevada, Stolt et al. [74] verificaram que o tratamento por alta pressão provocou mudanças nas propriedades reológicas do amido, tendo contudo permanecido os grânulos de amido intactos, sem libertação de amilose. A estrutura e propriedades reológicas das amostras processadas a alta pressão eram diferentes das amostras que sofreram tratamento térmico. Neste trabalho o comportamento de retrogradação de amido gelatinizado por pressão foi semelhante ao amido que sofreu tratamento térmico [74].

No estudo realizado por Blaszczyk et al. [45] com amido de batata, verificou-se que a superfície do grânulo de amido é mais resistente ao tratamento a alta pressão, sendo a parte interior do grânulo, após o processamento, preenchida com uma rede tipo gel com espaços vazios. Esse gel possivelmente tem origem na hidratação das regiões amorfas e/ou fusão da estrutura cristalina [45].

Por sua vez o trabalho de Katopo et al. [23], vem confirmar que o processamento por alta pressão, converte parcialmente amido com cristalinidade do tipo A em cristalinidade tipo B, mais resistente à pressão. No caso de amido do tipo A, quando processados em pó ou na presença de etanol, não se verificou a alteração de padrão de difração de raio-x do tipo A para o B [23].

Verificou-se no trabalho de Rubens et al. [76] que quando o amido é sujeito a pressão, as regiões amorfas dos grânulos de amido são hidratadas em primeiro lugar, tal como acontece com o amido gelatinizado por temperatura [76].

Na investigação de Liu et al. [59] foi confirmado no amido de trigo, milho (ceroso e normal) e batata, que a temperatura de gelatinização diminuiu (3,0 a 6,6°C) depois do amido ser processado a alta pressão na ausência de água. A entalpia de gelatinização correspondente também decresce. Estas mudanças são irreversíveis e mantiveram-se durante 6 meses a 25°C. Quando foram analisadas as amostras por microscopia eletrónica de varrimento, verificou-se que a pressão alterou significativamente a forma dos grânulos,

modificando a aparência da superfície. Relativamente à birrefringência do amido nativo e do processado, não se verificaram diferenças na análise microscópica de luz polarizada, possivelmente por não ser sensível o suficiente para mostrar as modificações no interior do grânulo ou por não existirem mudanças na estrutura interna do grânulo. Quanto ao padrão de difração de raio-x, estes foram semelhantes para o amido nativo e processado [59].

No entanto, quando processado como suspensão em água, já existe modificação de padrão de difração de raio-x, gelatinização e modificações da estrutura interna. No mesmo trabalho atrás referido, de Liu et al. [59], foram avançadas algumas explicações possíveis para as modificações encontradas. É avançada a hipótese que com processo de alta pressão a região amorfa do amido é alterada e tem menor temperatura de transição vítrea, alterações que podem incluir mudança de configuração da região amorfa ou plastificação pela água das regiões amorfas (devido a redistribuição da água) ou mesmo plastificação pelos fragmentos das moléculas de amido, que derivam da decomposição proporcionada pela alta pressão [59].

Por outro lado a diminuição da energia de fusão da região cristalina pode ser devida à fusão parcial da estrutura cristalina durante o processamento por alta pressão ou alterações da região cristalina [59].

O trabalho de Simonin et al. [77] mostra tal como já referido anteriormente, que o amido de arroz ceroso é mais sensível a processamento de alta pressão. Após 10 min. a 500MPa a estrutura granular desapareceu totalmente, obtendo-se um gel que atingiu o máximo de viscosidade [77].

No processamento a alta pressão de amidos não cerosos, os grânulos de amido retêm a sua estrutura devido à amilose (que não é libertada como acontece no processamento térmico) que estabiliza o grânulo possivelmente por existência de complexos estáveis com a amilopectina. No caso de amido ceroso, a amilopectina no grânulo é distorcida, levando à destruição da estrutura granular [77].

No entanto no trabalho feito por Vallons et al. [43] com amido de sorgo, não foram encontradas diferenças significativas nas propriedades reológicas e microestrutura do amido gelatinizado por alta pressão e por tratamento térmico, dentro dos intervalos de gelatinização, 300-600 MPa e 62-72°C respetivamente. A viscosidade de amido com pré-tratamento térmico e alta pressão é semelhante. [43]. Nos intervalos estudados verificou-se retenção da integridade granular para ambos os processamentos. Foi avançada a hipótese

da manutenção da estrutura do grânulo durante a pressurização ser possivelmente devida à estabilização dada pelas ligações de hidrogénio. Foi pelos autores referida a necessidade de estudar o comportamento do amido para além destes intervalos aqui referidos, uma vez que se verificou uma desintegração da estrutura granular, formação de uma pasta tipo esponja e uma diminuição da viscosidade aos 95°C [43].

No trabalho de Vittadini et al. [78] foi estudado o processamento de amido de tapioca a alta pressão. Foram obtidos géis mais duros e uma preservação parcial da estrutura granular nativa do amido para processamento a alta pressão. Para processamentos de alta pressão mais longos, de 30 minutos, houve um pequeno decréscimo na dureza do gel formado [78]. Durante o armazenamento todas as amostras ficaram mais rígidas e a recristalização da amilopectina foi maior para o amido processado termicamente do que para o amido processado por alta pressão. A maior dureza das amostras processadas a alta pressão pode talvez dificultar o processo de recristalização [78].



## 5 - Material e métodos



## 5.1 - Reagentes

- Amido de milho comercial Maizena
- Amido de arroz Sigma-Aldrich S7260
- Acetona destilada
- Etanol destilado

## 5.2 - Preparação das suspensões de amido

As suspensões de amido foram preparadas com água milli-Q sendo sujeitas a agitação à temperatura ambiente. Ao final de 30 minutos, e ainda com agitação, foi retirada a quantidade necessária de amostra de cada suspensão para a análise a efetuar. Foram analisadas suspensões de amido de milho com as concentrações de 15% (w/v), 5% (w/v), 2,5% (w/v), e 1% (w/v), e suspensões de amido de arroz com concentração de 1,5% (w/w).

## 5.3 - Processamento de alta pressão

As suspensões de amido de milho processadas a alta pressão foram preparadas com água milli-Q, numa concentração de 20% (w/v) sendo agitadas durante 30 minutos. De seguida foram transferidas para frascos de HDPE (polietileno de alta densidade). Esses frascos foram posteriormente embalados em vácuo.

As suspensões de amido de arroz processadas a alta pressão foram preparadas com água milli-Q, numa concentração de 10% (w/w) sendo agitadas durante 30 minutos. De seguida foram transferidas para frascos de HDPE. Esses frascos foram posteriormente embalados em vácuo.

O amido de milho foi processado num equipamento de alta pressão de escala industrial de 200 L, fabricado pela empresa Avure, a 500MPa, durante 5 minutos e à temperatura ambiente. O amido de arroz por sua vez foi processado no equipamento Unipress Equipment Modelo U33, durante 15 minutos, a uma pressão de 400MPa e às temperaturas de 5°C, 10°C, ambiente (23°C) e 34°C. À temperatura ambiente o

equipamento sofre um aumento de temperatura devido ao aumento de pressão de  $\sim 0,5^{\circ}\text{C}/100\text{MPa}$  e uma taxa de pressurização de  $\sim 4,5\text{MPa}/\text{segundo}$ .

Nos dois tipos de amido, após processamento, as suspensões foram centrifugadas, o sobrenadante foi excluído e o amido foi posteriormente liofilizado.

#### 5.4 - Microscopia eletrónica de varrimento

As imagens obtidas por microscopia eletrónica de varrimento foram realizadas recorrendo a um microscópio Hitachi SU-70 com uma aplicação de diferença de potencial (voltagem de feixe eletrónico) de 15kV e WD (distância de trabalho) de 15 mm e 16,6mm. O amido nativo ou pressurizado a alta pressão foi fixado numa fita de cobre e posteriormente revestido com ouro num evaporador a vácuo.

#### 5.5 - Microscopia de luz polarizada

Utilizou-se neste método um microscópio Olympus BH2-UMA (com filtros polarizadores), juntamente com um “hot stage” Mettler FP82HT para o aquecimento da amostra e um processador central Mettler FP90. As imagens foram registadas com uma máquina fotográfica Canon EOS 550D.

Foi feito um aquecimento das amostras de  $30^{\circ}\text{C}$  até  $85^{\circ}\text{C}$  a uma velocidade de  $2,0^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .

#### 5.6 - DSC

Na análise do amido com este método recorreu-se a um calorímetro diferencial de varrimento de compensação de potência Diamond DSC da PerkinElmer. A calibração foi realizada com índio e chumbo e para verificação da calibração foi usado apenas o índio.

A suspensão de amido foi preparada conforme descrito em 3.1. A amostra foi analisada em cápsulas de aço, com volume interno de 50  $\mu\text{l}$ . O aquecimento realizou-se no intervalo de  $20^{\circ}\text{C}$  e  $85^{\circ}\text{C}$  a uma velocidade de  $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$ .



Depois de analisados os resultados, são retiradas as seguintes informações:  $T_{\text{inicial}}$ ,  $T_{\text{final}}$ ,  $T_{\text{pico}}$  e  $\Delta H$ . Foi também registada a massa da amostra de cada análise. Todas as amostras foram analisadas em triplicado.

## 5.7 - Sensor acústico

Os cristais de quartzo utilizados eram de 9 MHz, corte AT, HC-6/U, polidos, com eletrodos de ouro e foram adquiridos na ICM - International Crystal Manufacturing Co, Inc.

Para a montagem do sensor acústico recorreu-se a uma célula de teflon e a um cristal de quartzo que se colocou no interior da célula. Foi introduzido 1,00 ml da suspensão de amido a analisar no reservatório da célula, ficando em contacto com uma das faces do cristal de quartzo.

Esta célula encontra-se numa câmara termostática Friocell 55 MMM Medcenter Einrichtungen GmbH, com capacidade de regulação de temperatura, sendo a temperatura da solução monitorizada por uma sonda Pt100 que se encontra mergulhada na amostra, tendo a entrada do reservatório da célula de teflon sido fechada com um septo de borracha.

Foram feitas leituras de frequência no intervalo de temperatura entre os 30 °C e 100 °C, às seguintes velocidades de aquecimento: 0,5, 1,0 e 2,0 °C/min, com posterior arrefecimento sem controlo de velocidade (em média 0,3 °C/min até aos ~48,0 °C e em média 1 °C/min até aos 30 °C).

O cristal de quartzo estava ligado a um analisador de rede/espectro/impedância Hewlett-Packard 4395A, juntamente com um “*Impedance test kit*” Hewlett-Packard 43961A e um “*Spring clip fixture*” Hewlett-Packard 16092A. A frequência em série foi lida em intervalos de 0,5 °C. O analisador de impedâncias é configurado para fazer análise entre 8,5 MHz e 9,5 MHz, com média das últimas 4 leituras e com largura de banda de 100 kHz, tendo sido posteriormente sempre centrado à frequência de ressonância e o intervalo de leitura apertado para 300 Hz.

No final de cada análise, o cristal de quartzo foi retirado da célula, procedendo-se à limpeza do mesmo num banho de água quente, sendo posteriormente lavado com etanol e acetona. Depois de seco, e antes de o introduzir de novo na célula de teflon, foi verificado se a frequência de ressonância era igual à inicial (antes da análise) e se a resistência era

igual a 0, procedendo-se a um novo ciclo de limpeza sempre que estas duas condições não fossem satisfeitas.

## 6 - Resultados e discussão de resultados



## 6.1 - Morfologia externa do amido de milho

Quando o amido de milho nativo foi analisado no microscópio eletrônico de varrimento, obtiveram-se as figuras 6 e 7.

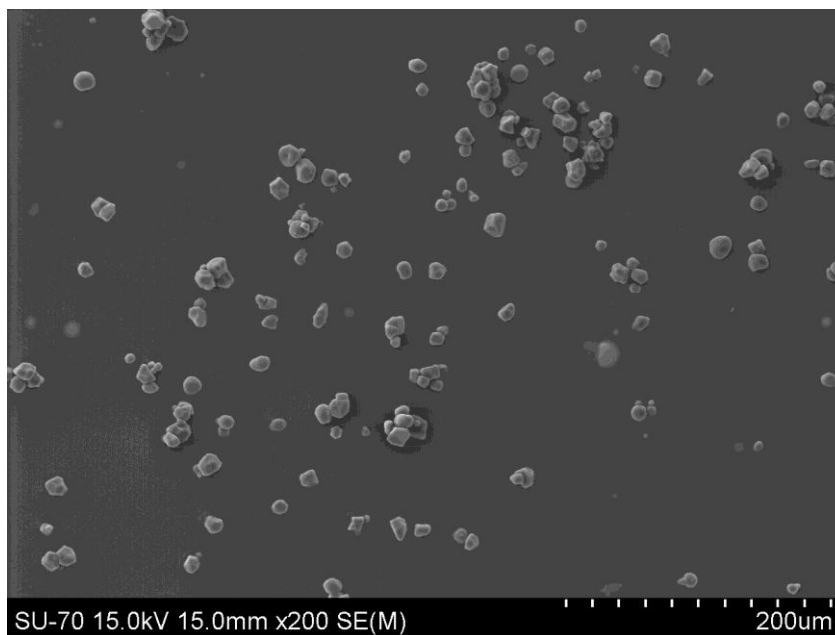


Figura 6 - Grânulos de amido de milho nativo com ampliação de 200x e WD de 15 mm.

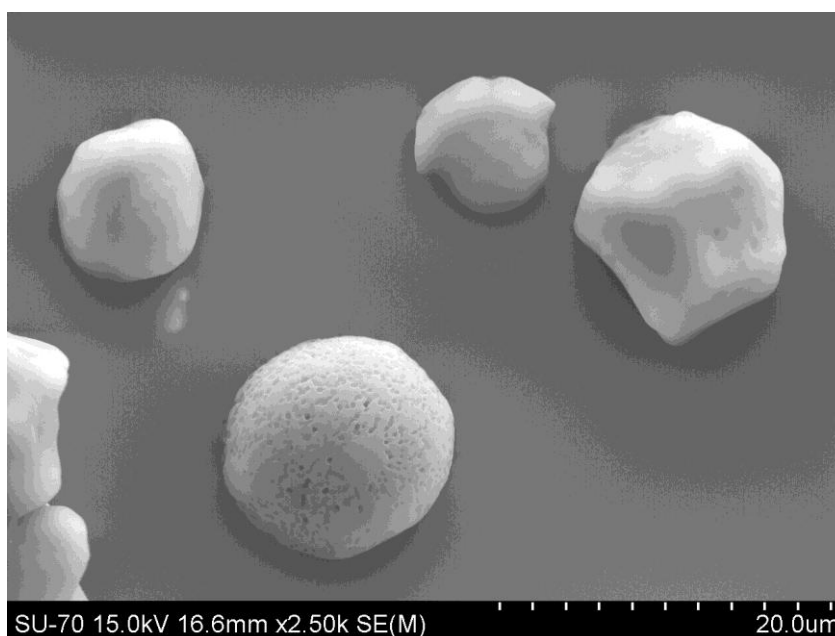


Figura 7 - Grânulos de amido de milho nativo com ampliação de 2500x e WD de 16,6 mm.

As figuras 8 e 9 correspondem ao amido de milho processado a alta pressão quando analisado pelo mesmo método.

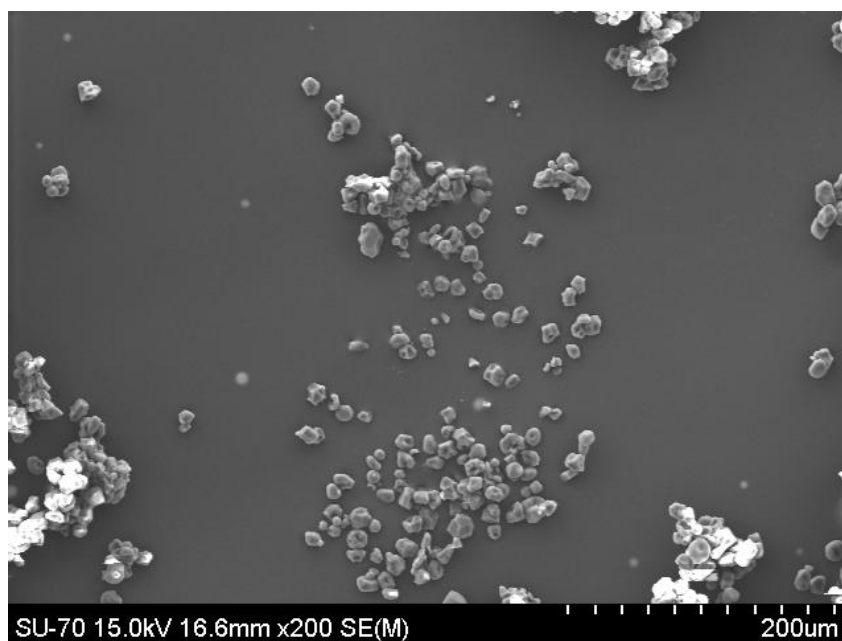


Figura 8 - Grânulos de amido de milho processado a alta pressão com ampliação de 200x e WD de 16,6 mm.

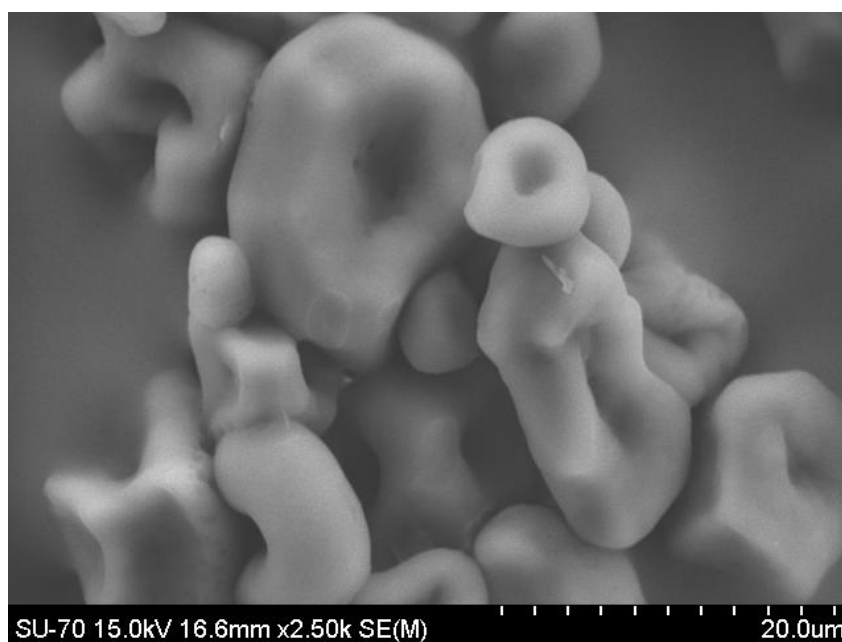


Figura 9 - Grânulos de amido de milho processado a alta pressão com ampliação de 2500x e WD de 16,6 mm.

É possível verificar na figura 6 que todos os grânulos apresentam diversas formas e tamanhos, variando entre 7 e 15  $\mu\text{m}$  de diâmetro.

Na ampliação (figura 7) é possível ver alguns poros superficiais num dos grânulos. Há referência na literatura à possível existência de poros na superfície dos grânulos, existindo a possibilidade de alguns grânulos possuírem muitos poros, enquanto que outros podem não apresentar nenhum poro [13].

Desta forma, o grânulo de amido pode ser considerado como material poroso, exibindo superfície externa e interna. A primeira é determinada pela forma e tamanho das partículas e a segunda definida pela estrutura capilar da partícula hidratada e pelo tamanho do reagente penetrante [13].

Quando comparado o amido nativo com o amido processado a alta pressão, principalmente na ampliação mais elevada (figura 7 e 9), são notórias as diferenças existentes entre os dois amidos. É possível verificar que os grânulos processados a alta pressão apresentam agora uma forma tipo “*donut*”, que se mantiveram inteiros, não sofreram nenhuma ruptura visível na sua superfície, mas que o seu interior foi de alguma forma afetado pelo processamento a alta pressão.

Esta mesma característica foi já verificada em trabalhos anteriores como o de Vallons et al. [43] para amido de sorgo, em que se verificou uma aparência do grânulo de amido processado a alta pressão, com uma forma tipo “*donut*” [43].

Também no trabalho de Blaszcak et al. [45] com amido de batata, se pode encontrar referência a deformações dos grânulos causadas pela pressão e posterior liofilização. Estas mudanças ocorrem principalmente a nível interno, uma vez que a superfície do grânulo é mais resistente a alta pressão. Neste trabalho verificou-se a existência de uma estrutura tipo gel no interior do grânulo com espaços livres que permaneceram após evaporação da água durante a liofilização. Esta estrutura tipo gel poderá ser resultado da hidratação das regiões amorfas ou da fusão das estruturas cristalinas [45].

Mesmo a pressões mais elevadas pode não ser visível a desintegração completa dos grânulos, devido à estabilização das ligações de hidrogénio, que não permitem uma total desintegração da região cristalina [43]. O conteúdo de amilose no grânulo de amido é de extrema importância para a resistência à alta pressão, uma vez que durante este

processamento existe uma libertação mínima de amilose, sendo esta importante para estabilizar a estrutura cristalina, não ocorrendo a fusão da amilopectina [25].



## 6.2 - Gelatinização, “*pasting*” e retrogradação do amido de milho

Através da microscopia de luz polarizada é possível ao investigador analisar a perda de birrefringência, pelo desaparecimento da cruz de malta, permitindo concluir que o grânulo passa de um estado ordenado para um estado desordenado [56]. A birrefringência implica assim a existência de um elevado grau de ordem molecular no grânulo. A cristalinidade não é um pré-requisito de birrefringência [55].

Na figura 10 pode ver-se um grânulo de amido nativo a perder a cruz de malta (birrefringência) com o aumento da temperatura da amostra.

A monitorização das amostras de amido nativo e processado a alta pressão quando sujeitas a um aumento de temperatura de 2,0 °C/minuto é apresentada nas figuras 11 e 12 respetivamente.

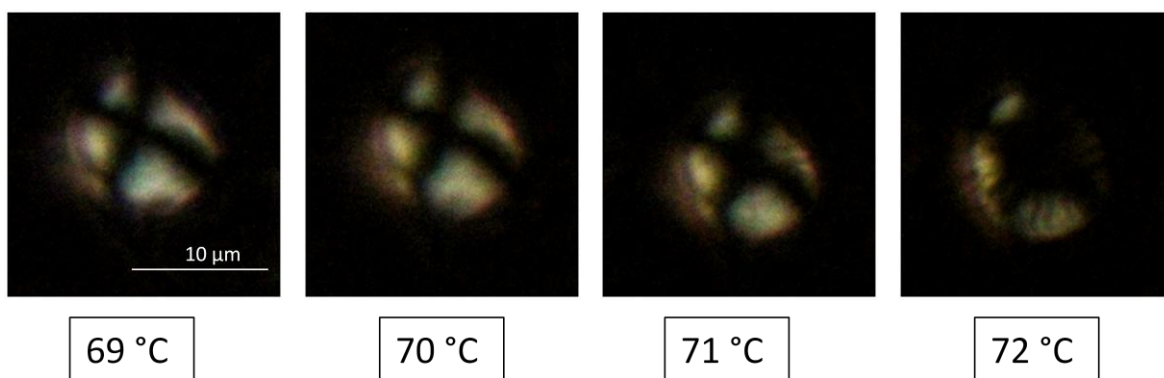
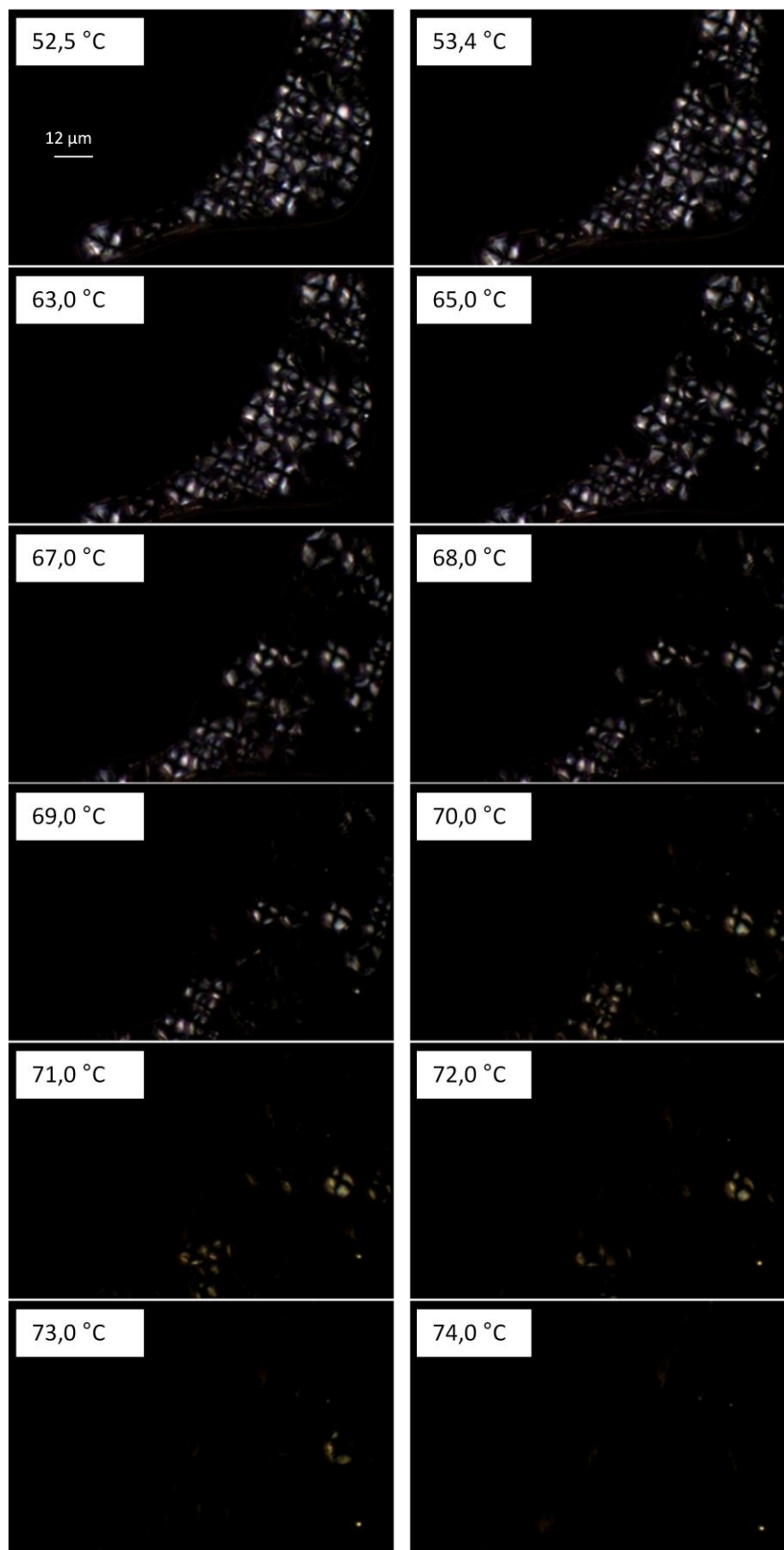
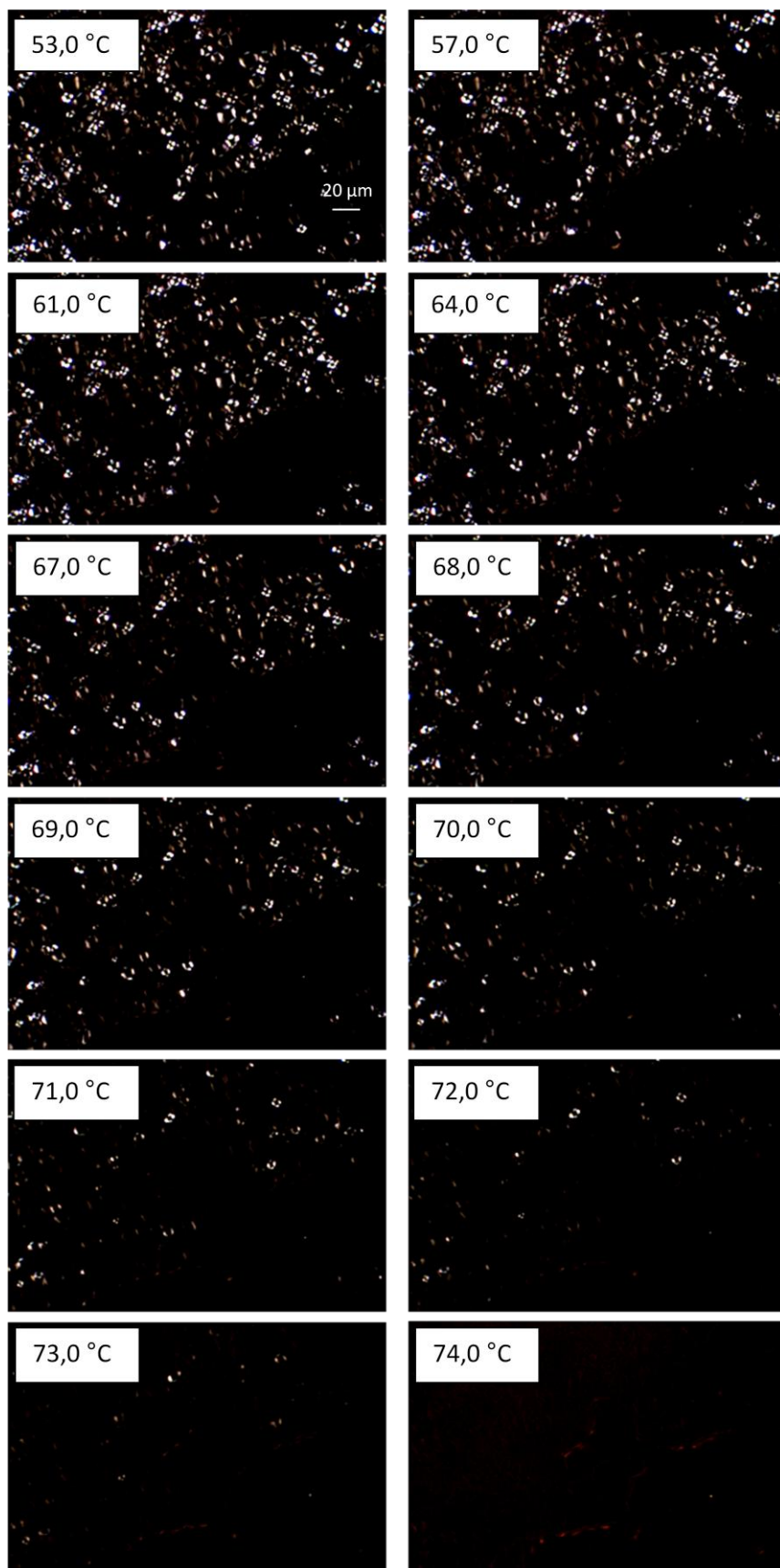


Figura 10 - Monitorização de um único grânulo de amido nativo (suspensão 2,5% w/v) nos últimos instantes de perda de birrefringência, velocidade de aquecimento 2,0 °C/min.



**Figura 11 - Evolução da perda de birrefringência dos grânulos de amido nativo (suspensão 2,5% w/v), velocidade de aquecimento 2,0 °C/min.**



**Figura 12 - Evolução da perda de birrefringência dos grânulos de amido processado por alta pressão (suspensão 2,5% w/v), velocidade de aquecimento 2,0 °C/min.**

Na figura 11 (amido nativo) é possível analisar o comportamento dos grânulos de amido com o aumento de temperatura, relativamente à presença/ausência da cruz de malta. Até aos 63,0 °C o número de cruces de malta manteve-se praticamente inalterado desde o início da análise. No entanto, a partir desta temperatura é possível observar o desaparecimento de cruces de malta. Aos 67,0/68,0 °C cerca de metade dos grânulos da amostra já perderam a sua birrefringência. Pode-se concluir que aos 74,0 °C deixa de existir qualquer vestígio de cruz de malta na amostra, o que indica a perda da totalidade da birrefringência do material. A esta temperatura todos os grânulos passaram de um estado ordenado para um estado desordenado.

Na figura 12 (amido processado), até aos 64,0 °C não se verifica mudanças significativas no número de cruces de malta apresentado pelos diversos grânulos. Após esta temperatura existe uma diminuição considerável do número de grânulos que apresentam birrefringência, aos 69/70 °C cerca de metade dos grânulos perderam a sua birrefringência. À temperatura de 74,0 °C deixa de ser visível qualquer cruz de malta na amostra analisada, o que indica que todos os grânulos perderam a sua birrefringência.

Quando o amido processado a alta pressão foi analisado à temperatura ambiente, em microscopia de luz polarizada, já existiam grânulos de amido que não apresentavam cruz de malta. Os grânulos eram visíveis mas surgiram como uma espécie de sombra, estes grânulos são denominados em alguns trabalhos como grânulos fantasma [41]. No amido nativo não se verificou este facto. Já Brouillet-Fourmann et al. [41] tinham observado que as entidades granulares se converteram em grânulos fantasmas, numa suspensão de amido de milho sujeita a temperaturas superiores a 70°C, devido a saída de amilose e à dissociação das camadas cristalinas da amilopectina [41].

Este método ótico permite detetar modificações físicas na estrutura semicristalina dos grânulos de amido, sendo capaz de mostrar a gelatinização de um pequeno número de grânulos de amido [79]. No trabalho de Douzals et al. [79] é referido que quando se compara o método ótico com os resultados obtidos no DSC, o primeiro sobrestima sistematicamente a fração fundida (gelatinizada) em cerca de 20% [79].

Liu et al. [59], num trabalho em que amido de trigo e milho foram processados a alta pressão na ausência de água, verificaram que através da microscopia de luz polarizada não era possível fazer uma distinção exata em termos de birrefringência entre grânulos nativos e grânulos processados a alta pressão. Os resultados revelaram que, para este tipo

de processamentos, a birrefringência não é suficientemente sensível para refletir as mudanças da estrutura interna, sendo igualmente possível que a não detecção de alterações se deva à inexistência de mudanças internas na estrutura do grânulo [59].

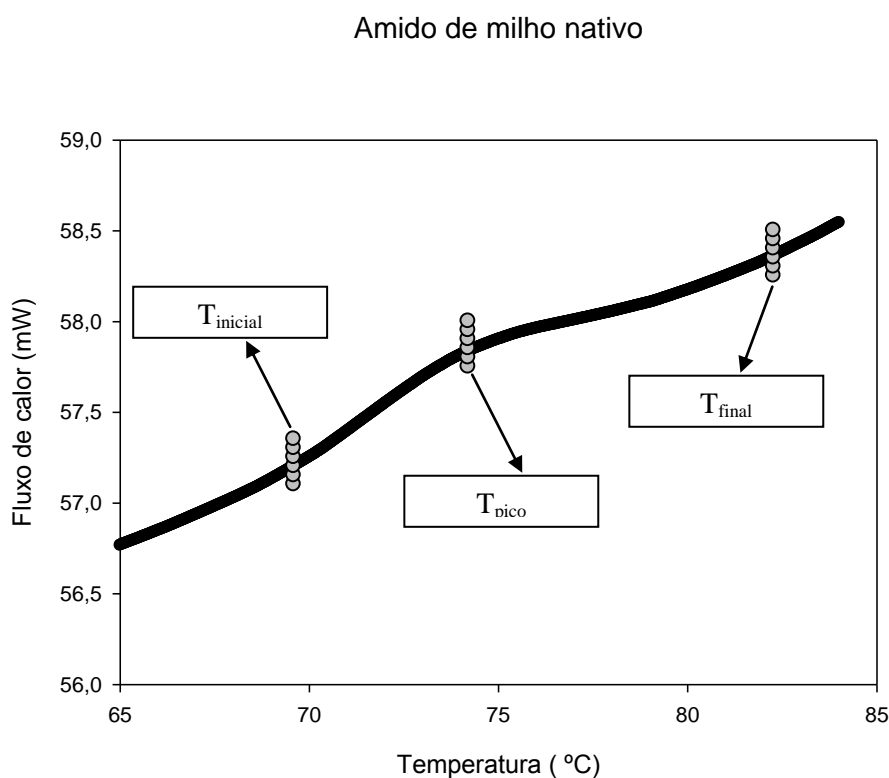
No estudo de amido de sorgo por Vallons et al. [43], quando analisado amido processado a alta pressão e amido processado termicamente, verificou-se uma concordância entre os resultados de DSC e resultados de microscopia confocal de varrimento laser. Assim, quando o amido deixou de apresentar qualquer pico no DSC após tratamento (ausência de entalpia de transição), a mesma amostra quando observada em microscopia, também não apresentava qualquer cruz de malta [43].

Os resultados obtidos por outros investigadores dependem em grande medida do tipo de amido, da pressão aplicada durante o processamento e do tempo decorrido até à análise. Assim, no estudo de amido de arroz processado a 400MPa, Oh et al. [28] quando analisaram as amostras em microscopia, concluíram que alguns grânulos tinham perdido a birrefringência, a pressões mais elevadas (500MPa) o material não apresentou birrefringência. No entanto, há que ter em consideração que neste estudo as amostras repousaram cerca de 10 horas entre o tratamento de alta pressão e a análise no microscópio [28]. A inexistência de birrefringência no amido de arroz, após processamento a pressões elevadas, indica que o inchamento dos grânulos durante o período de processamento foi suficiente para a distorção da região cristalina, resultando na ausência de birrefringência, no entanto, não sendo suficiente para a destruição da estrutura granular [28].

Hibi et al. [80] analisaram também amido de milho processado a alta pressão, por microscopia de luz polarizada, verificando que vários grânulos após processamento (sem tempo de espera entre processamento e análises) tinham perdido a cruz de malta. No entanto, na análise de amido de batata processado à mesma pressão, todos os grânulos continuavam a apresentar cruz de malta [80].

Os parâmetros obtidos no DSC podem ser definidos da seguinte forma: temperatura inicial ( $T_{\text{inicial}}$ ) – que corresponde à temperatura da interseção da linha base com a tangente da primeira metade do pico de gelatinização do DSC ou à temperatura onde se inicia a perda de birrefringência, temperatura pico ( $T_{\text{pico}}$ ) – temperatura à qual a curva de transição atinge o máximo, temperatura de gelatinização ( $T_{\text{gel}}$ ) – temperatura do ponto médio da curva de transição do DSC ou a temperatura onde metade dos grânulos de amido perderam a birrefringência, temperatura final ( $T_{\text{final}}$ ) – que irá corresponder à temperatura da interseção da linha base com a tangente da segunda metade do pico de gelatinização do DSC ou à temperatura onde 90% dos grânulos de amido perderam a birrefringência [49].

Na figura 13 e 14 apresentam-se respectivamente os resultados obtidos por DSC para uma amostra de amido de milho nativo e processado a alta pressão.



**Figura 13 – Resultado obtido por DSC para uma amostra de amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Aquecimento efetuado entre 20 °C e 85 °C a uma velocidade de 20 °C/min.**

### Amido de milho processado a alta pressão

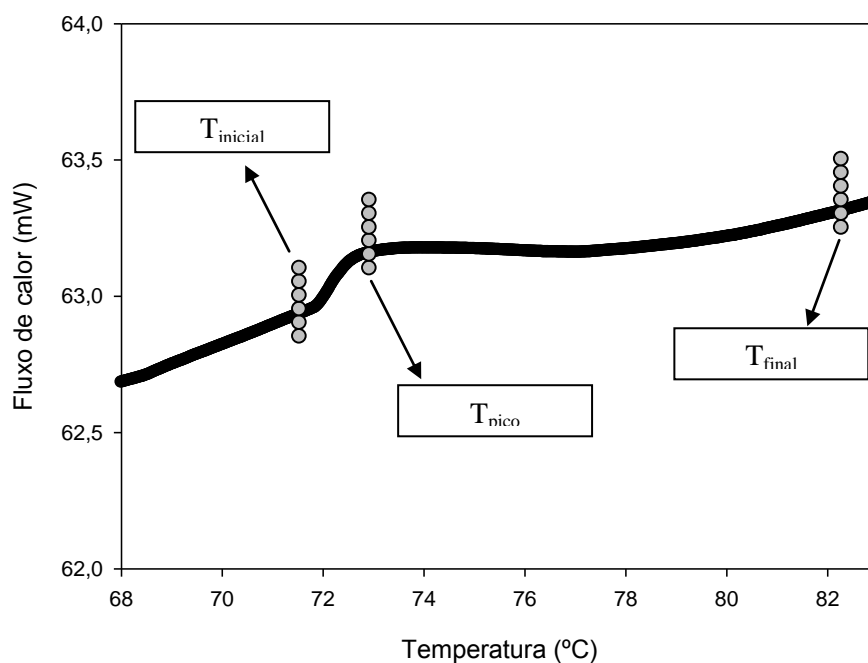


Figura 14 – Resultado obtido por DSC para uma amostra de amido de milho processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v). Aquecimento efetuado entre 20 °C e 85 °C a uma velocidade de 20 °C/min.

Na tabela 2 e 3 apresentam-se respetivamente as temperaturas características obtidas por DSC, bem como as entalpias de transição, para 3 réplicas de amido de milho nativo e 3 réplicas de amido de milho processado a alta pressão.

Tabela 2 - Temperatura inicial, pico, final, gelatinização e  $\Delta H$  de transição obtido no DSC para o amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v).

AMIDO NATIVO						
Replica	Massa da amostra (mg)	T <sub>inicial</sub> (°C)	T <sub>pico</sub> (°C)	T <sub>final</sub> (°C)	$\Delta H$ (J/g)	T <sub>gel</sub> (°C)
1	40,400	69,60	74,21	82,28	0,1053	75,94
2	40,320	69,40	73,96	79,18	0,1343	74,29
3	39,450	69,40	74,04	79,86	0,1696	74,63
<b>Mediana</b>	<b>40,320</b>	<b>69,40</b>	<b>74,04</b>	<b>79,86</b>	<b>0,1343</b>	<b>74,63</b>

**Tabela 3 - Temperatura inicial, pico, final, gelatinização e  $\Delta H$  de transição obtido no DSC para o amido de milho processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v).**

AMIDO PROCESSADO						
Replica	Massa da amostra (mg)	T <sub>inicial</sub> (°C)	T <sub>pico</sub> (°C)	T <sub>final</sub> (°C)	$\Delta H$ (J/g)	T <sub>gel</sub> (°C)
1	41,680	71,54	72,93	82,28	0,0936	76,91
2	42,340	69,32	73,44	82,12	0,0453	75,72
3	42,000	69,41	73,07	80,07	0,0389	74,74
<b>Mediana</b>	<b>42,000</b>	<b>69,41</b>	<b>73,07</b>	<b>82,12</b>	<b>0,0453</b>	<b>75,72</b>

Através deste método verifica-se uma diminuição acentuada no valor de  $\Delta H$  do amido processado a alta pressão, o que reflete o facto de este processamento afetar o amido de forma a ser necessário menos energia para que ocorra a fusão da estrutura cristalina.

Relativamente às temperaturas de transição, a temperatura de início de fusão dos cristais é semelhante para o amido nativo e processado (69,40 °C e 69,41 °C), no entanto as temperaturas pico já apresentam diferenças, sendo a temperatura pico do amido nativo mais elevada (74,04 °C) que a do amido processado (73,07 °C). A temperatura final de transição de fase é mais elevada para o amido processado (82,12 °C) do que para o amido nativo (79,86 °C). A temperatura de gelatinização é mais elevada para o amido de milho processado a alta pressão (75,72 °C), sendo a temperatura de gelatinização do amido nativo mais baixa (74,63 °C).

Assim, é possível concluir que a transição de fase começa à mesma temperatura para os dois amidos de milho, sendo mais longa para o amido processado a alta pressão, necessitando este de temperaturas mais elevadas para que ocorra transição de fase em todos os grânulos da amostra. Isto deve-se possivelmente ao facto de alguns grânulos de amido se tornarem mais resistentes durante o processamento de alta pressão e liofilização, por formação de ligações mais estáveis na estrutura cristalina. No trabalho de Vallons et al. [43] no estudo de amido de sorgo processado a alta pressão, explicaram o aumento das temperaturas de fusão com a pressão aplicada, pela perda das estruturas cristalinas menos estáveis. Neste trabalho foi também verificado que a entalpia de transição diminui com a pressão aplicada [43].

O pico da curva de transição dá-se a temperaturas mais baixas para o amido processado a alta pressão, o que indica que a maioria dos grânulos de amido processados, necessitam de menor quantidade de energia para que ocorra fusão da estrutura cristalina.



No trabalho de Blaszczyk et al. [45], onde foi utilizado um método de processamento semelhante para amido de batata, a análise de DSC demonstrou uma diminuição das temperaturas de transição de fase, para processamentos a 600MPa (2 e 3 minutos). Uma diminuição da entalpia de transição também foi verificada [45].

A temperatura final de transição do DSC deveria ser semelhante à temperatura final de perda de birrefringência, no entanto isso não se verifica. A temperatura final de DSC para amido nativo e processado a alta pressão é respectivamente de 79,86 °C e 82,12 °C, enquanto que a temperatura final de perda de birrefringência é de 74,0 °C para ambos os amidos de milho. Para este facto, é necessário ter em consideração que as temperaturas de aquecimento foram diferentes nas duas técnicas, 2 °C/min para microscopia de luz polarizada e 20 °C/min para o DSC.

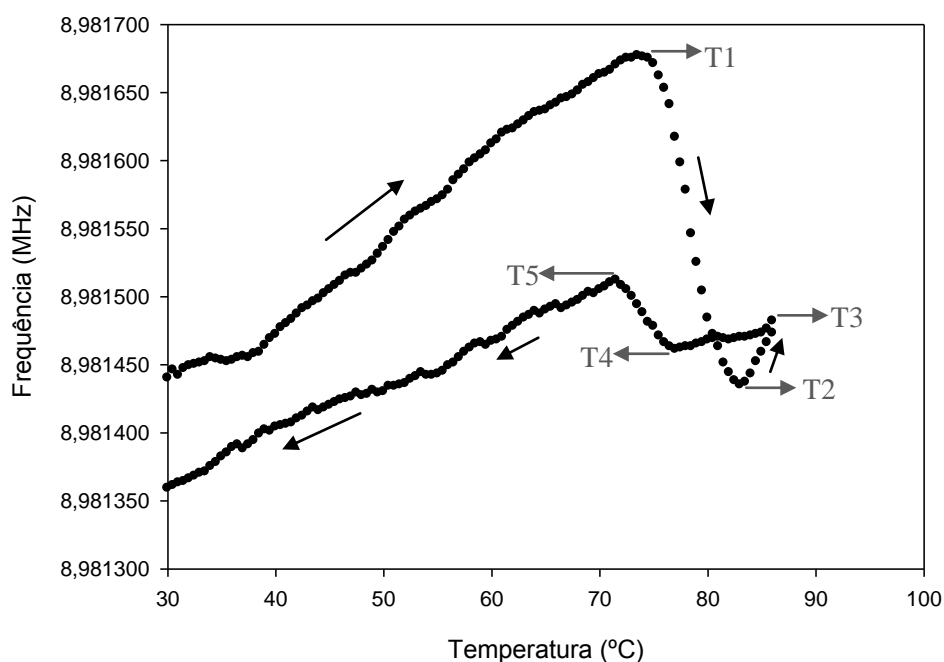
Aparicio et al. [49] verificaram no seu trabalho que a velocidade de aquecimento influencia os valores obtidos no DSC. Normalmente quanto maior a velocidade de aquecimento, maior as temperaturas de transição.

Uma possível explicação para a dependência do amido relativamente à velocidade de aquecimento, poderá advir do facto de quando o grânulo de amido atinge um certo grau de dissolução, um processo não reversível é desencadeado, onde cadeias poliméricas saem do grânulo e interagem com o solvente e outros grânulos. Este processo de migração (difusão de cadeias) é dependente do tempo e não da temperatura, assim o acoplamento com anteriores processos vai depender da velocidade de aquecimento [49].

Com o sensor acústico foram analisadas suspensões de amido de milho nativo à concentração de 2,5% (w/v). Tentaram-se analisar outras concentrações como, 15% (w/v), 5% (w/v) e 1% (w/v), verificando-se no final que a concentração ideal para o estudo das propriedades viscoelásticas da suspensão de amido é a suspensão de 2,5% (w/v). Nas restantes concentrações, não foi possível obter um resultado por parte do sensor, possivelmente devido a uma viscosidade muito elevada nas concentrações maiores. Relativamente à suspensão de 1% (w/v), o resultado do sensor não é conclusivo devido a um aumento constante da frequência até ao momento em que o cristal para de vibrar.

A velocidade de aquecimento adotada inicialmente foi a de 2 °C/min, obtendo-se o resultado presente na figura 15. A temperatura máxima atingida na amostra é de 86,0 °C.

#### Amido de milho nativo - velocidade de aquecimento 2°C/min



**Figura 15** - Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

A figura 15 representa o comportamento do amido de milho nativo quando sujeito a um aumento de temperatura de 2 °C/min. Na tabela 4 podem ver-se os valores das temperaturas características obtidas para 3 amostras de amido nativo analisadas no sensor acústico e a respetiva mediana.

**Tabela 4 - Temperaturas características obtidas no sensor acústico para 3 amostras de amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v), com aquecimento de 2,0 °C/min.**

Temperaturas Características (°C) Réplicas	T1	T2	T3	T4	T5
1	73,5	83,0	86,0	77,0	71,5
2	72,0	82,5	86,0	77,5	71,5
3	74,5	83,5	86,0	76,5	72,0
<b>Mediana</b>	<b>73,5</b>	<b>83,0</b>	<b>86,0</b>	<b>77,0</b>	<b>71,5</b>

Verifica-se um aumento de frequência entre os 30,0 °C e os 73,5 °C (T1), o que indica uma diminuição da viscosidade. À medida que se aquece uma suspensão de amido, existe entrada de água para o interior dos grânulos e saída de amilose do seu interior. Os grânulos nesta fase incham, devido às ligações de hidrogénio que se rompem e os grupos hidroxilo da amilose e amilopectina ligam-se por pontes de hidrogénio à água [16, 49].

Esta difusão de água para o interior do grânulo, ocorre principalmente quando este não é perfeito. Apesar deste fenómeno, a amostra continua a comportar-se como um material semicristalino, uma vez que a matriz é composta por grãos sólidos e pouco elásticos onde as interações são reduzidas e que continuam dispersos numa pequena quantidade de líquido [41].

A entrada de água ocorre primeiro nos anéis de crescimento amorfos. Quando é atingido um certo grau de inchamento, um certo stress disruptivo é transmitido no interior do grânulo, pelas moléculas que ligam as regiões amorfas às cristalinas [1].

Durante o aquecimento as ligações de hidrogénio que estabilizam a estrutura de dupla hélice na região cristalina são rompidas e substituídas por água (ligações de hidrogénio) [29].

Existem dois fatores contraditórios nesta fase inicial de aquecimento relativamente à viscosidade, primeiro a viscosidade da amostra pode aumentar durante a gelatinização devido à dissolução do amido, segundo, tal como outros materiais a viscosidade pode diminuir com o aumento da temperatura [60]. Em face do aumento de frequência que se observa até aos 73,5 °C (T1) teremos que concluir pela predominância deste segundo fator.

A presença do primeiro poderá justificar alguma irregularidade na subida da frequência, excetuando algumas contribuições aleatórias do ruído instrumental.

Aos 73,5 °C (T1) a frequência começa a diminuir, esta será a temperatura onde a amilopectina dos grânulos de amido fundiu por completo, fenómeno verificado pela perda de birrefringência aos 74 °C. Esta temperatura deveria corresponder à temperatura final no DSC, se a velocidade de aquecimento tivesse sido a mesma. Assim, a temperatura é inferior à final de transição do DSC, o que é compatível com o facto dos processos que ocorrem na gelatinização do amido serem dependentes do tempo. A velocidades mais elevadas é necessário mais tempo, e logo temperaturas mais elevadas, para atingir o final da transição de fase no DSC [49].

Esta temperatura é normalmente definida como temperatura de pasta “*pasting*”, detetada por reologia. Isto corresponde a um aumento da viscosidade até aos 83,0 °C (T2). Possivelmente isto acontece devido ao facto de após algum inchamento dos grânulos, o contínuo aumento de temperatura que levou à fusão da amilopectina, permitiu que uma importante quantidade de amilose que estava aprisionada entre as camadas de amilopectina seja libertada, assim como uma pequena quantidade que se encontrava nos cristais de amilopectina [41].

Nesta fase suficiente quantidade de água e amilose saíram do grânulo, obtendo-se um comportamento tipo líquido da amostra, composto por uma solução de amilose que contem entidades granulares. Depois de adquirido este comportamento, a difusão de amilose continua com o contínuo aquecimento, ficando a solução cada vez mais concentrada em amilose, o que leva a um aumento da viscosidade [41].

Nesta fase, as camadas de amilopectina já se dissociaram embora se mantenham em contacto entre si, devido às ramificações que possuem. Surge um sistema tipo gel, onde a maioria dos grânulos gelatinizados que contem amilopectina, se encontram juntos numa solução concentrada em amilose [41].

É importante referir que a fusão da amilopectina antecede sempre a gelificação sempre que existe uma grande quantidade de água [41].

A viscosidade da amostra analisada aumenta até um máximo, temperatura de 83,0 °C (T2), que corresponde ao ponto em que os grânulos se encontram inchados ao máximo mas continuam intactos [1].

A partir desta temperatura, existe um novo aumento da frequência até aos 86,0 °C (T3), devido à diminuição da viscosidade. Esta diminuição, deve-se à rutura total dos grânulos de amido que se encontravam dispersos [1].

A rutura é favorecida pelo cisalhamento. No caso de um sistema sem cisalhamento, os grânulos não são completamente solubilizados até uma temperatura que ronda os 120 °C [42]. A velocidade de cisalhamento é muito superior nos sistemas reológicos do que no caso de se usar um sensor acústico, sendo previsível que a temperatura a que ocorre a rutura dos grânulos seja superior no presente caso.

Durante o arrefecimento, entre os 86,0 °C (T3) e os 77,0 °C (T4) verifica-se uma pequena diminuição da frequência, sendo o aumento de viscosidade explicado pelo início de formação de uma pasta onde a amilopectina e a amilose se encontram juntas por interações moleculares [1]. A pasta de amido é uma massa viscosa, que contém uma fase contínua de amilose e amilopectina solubilizadas e uma fase descontínua de grânulos fantasma e fragmentos [42].

Entre os 77,0 °C (T4) e 71,5 °C (T5) existe um aumento de frequência, que revela uma diminuição da viscosidade, explicada pela interação da amilose solubilizada com lípidos (principalmente polares). A formação de hélices de amilose com lípidos no interior, ao cristalizarem durante o arrefecimento, leva provavelmente à diminuição da viscosidade [58, 81]. Há um restabelecimento de alguma ordem embora as ligações agora formadas não permitam a reposição do sistema inicial, o que é facilmente comprovado pela frequência de ressonância muito inferior à que se atingiu durante o aquecimento.

Verificou-se de seguida um novo aumento de viscosidade até aos 30,0 °C (diminuição da frequência). Este aumento de viscosidade deve-se ao facto da pasta de amido formada arrefecer [1].

Com o sensor acústico não é assim possível determinar uma temperatura de gelatinização, tal como não é possível com os métodos reológicos, uma vez que é definida como a temperatura à qual metade dos grânulos gelatinizam.

Amido de milho nativo - velocidade de aquecimento 1,0 °C/min

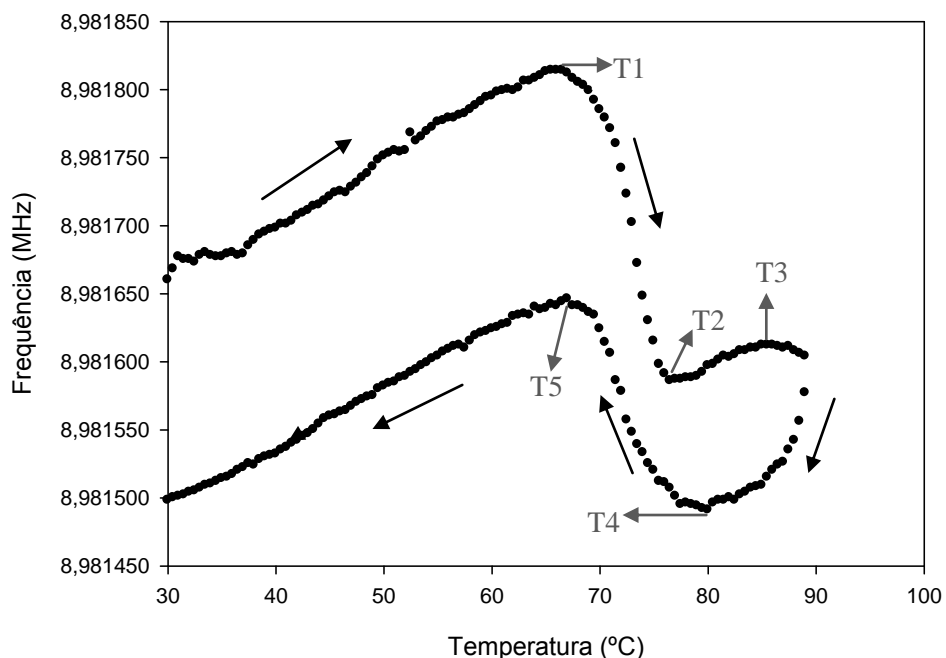


Figura 16 - Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 1,0 °C/min.

Amido de milho nativo - velocidade de aquecimento 0,5°C/min

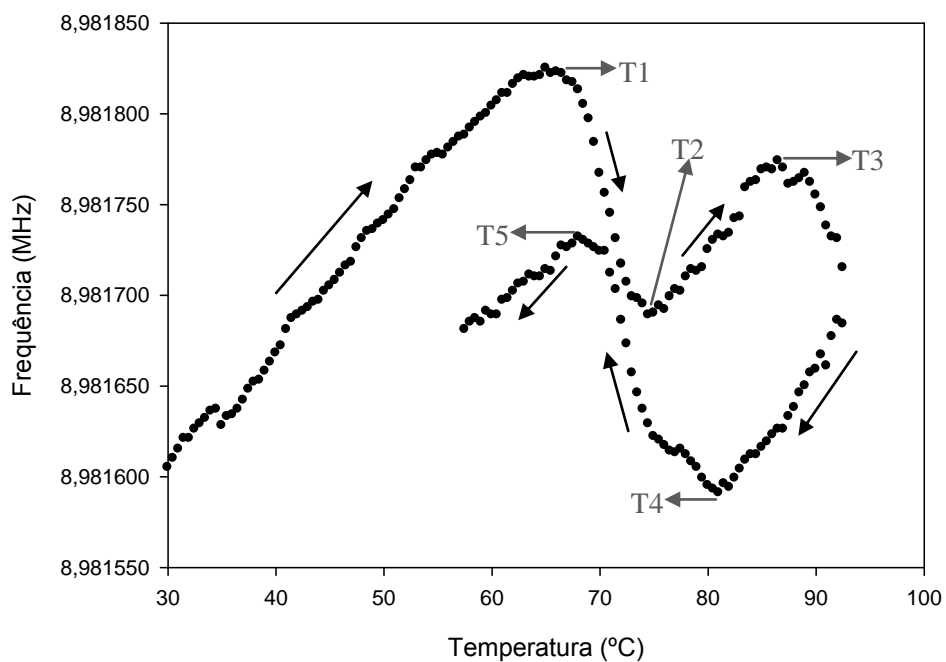


Figura 17 - Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 0,5 °C/min.

Quando a mesma análise é efetuada a velocidades de aumento de temperatura mais baixas, 1,0 e 0,5°C/min, verifica-se o mesmo comportamento da amostra de amido com alguns dos processos a ocorrerem a temperaturas mais baixas. A temperatura máxima atingida pelas amostras foi de 89,0 e 92,5 °C respetivamente.

No trabalho de Verissimo et al. [47], onde também foi utilizado um sensor acústico, a velocidade de aquecimento influenciou a experiência. Quanto maior as velocidades de aquecimento, maiores as temperaturas a que se iniciava o processo de gelificação de HPMC [47].

Na figura 17 (velocidade de aquecimento de 0,5 °C), a monitorização da frequência finalizou-se aos 57,5 °C, uma vez que a partir desta temperatura o sensor deixou de funcionar.

Na tabela 5 encontram-se as temperaturas às quais existe mudança de orientação da frequência, nas análises efetuadas às várias velocidades de aquecimento.

**Tabela 5 – Temperaturas características obtidas no sensor acústico, a várias velocidades de aquecimento, para amido de milho nativo (suspensão 2,5% w/v).**

Velocidade de aquecimento (°C/min) \ Temperaturas características (°C)	T1	T2	T3	T4	T5
2,0	73,5	83,0	86,0	77,0	71,5
1,0	66,0	76,5	86,0	80,0	68,0
0,5	65,0	74,5	86,5	81,0	66,5

Na tabela 5 é possível constatar que durante o aquecimento, quanto menor a velocidade, mais baixas são as temperaturas T1 e T2. Na fase de arrefecimento, quanto menor a velocidade de aquecimento, maior a temperatura de T4 e menor a temperatura de T5.

Assim, é possível concluir que com velocidades de aquecimento mais baixas, a fusão da estrutura cristalina no grânulo termina a temperaturas mais baixas, iniciando-se

mais cedo o aumento da viscosidade (T1). O máximo de viscosidade atingido durante o aquecimento (T2) dá-se também a temperaturas mais baixas. Pode-se considerar que estes fenómenos dependem do fator tempo.

Relativamente à temperatura T3, que corresponde ao momento em que todos os grânulos sofreram a devida rutura, implicando a diminuição da viscosidade, esta é semelhante para todas as velocidades de aquecimento, não sendo este um fenómeno que dependa do fator tempo.

Na análise dos gráficos 15, 16 e 17 e devida comparação, é possível verificar que entre a temperatura T3 e T4 (momento de transição de aquecimento para arrefecimento), menores velocidades de aquecimento, levam a maiores viscosidades adquiridas pela pasta. De referir que quanto menor a velocidade aplicada, maior a temperatura atingida pela amostra, como já foi referido anteriormente. É assim essencial para a viscosidade da pasta, a temperaturas elevadas, a velocidade de aquecimento aplicada à amostra assim como a temperatura atingida.

As diferenças até agora verificadas, pela variação da velocidade de aquecimento, vão levar a consequências na fase do arrefecimento. As pastas formadas a velocidades de aquecimento mais baixas, com maior viscosidade, vão sofrer uma diminuição da viscosidade (pela possível cristalização de amilose com lípidos) a temperaturas mais elevadas (T4), isto é, mais cedo. Esta fase de diminuição de viscosidade é mais longa (maiores intervalos de temperatura) para velocidades de aquecimento mais baixas (0,5 °C/min – 14,5 °C, 1,0 °C/min – 12,0 °C e 2,0 °C/min – 5,5 °C), possivelmente pela maior viscosidade adquirida pela pasta.

É possível concluir através deste método, que a velocidade de aquecimento aplicada influencia os fenómenos que ocorrem durante a gelatinização e após a mesma. Os fenómenos que ocorrem no grânulo de amido, quando este se encontra na presença de água e é aquecido, dependem do fator tempo e temperatura.

Foi realizado um estudo semelhante ao já descrito para o amido nativo, para amido processado a alta pressão a 400MPa, durante 5 minutos e à temperatura ambiente.

Na figura 18 encontra-se representado o comportamento do amido de milho processado a alta pressão, quando analisado no sensor acústico a uma velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min. Na tabela 6 encontram-se as temperaturas características para 3 réplicas de amido processado a alta pressão.



Amido de milho processado - velocidade de aquecimento 2,0 °C/min

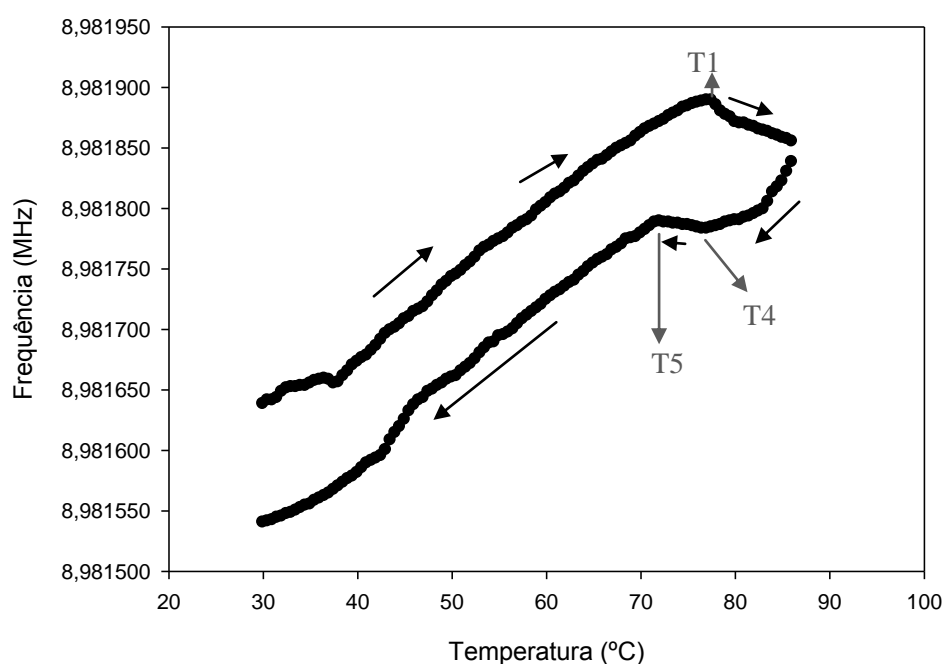


Figura 18 - Resultado obtido no sensor acústico para amido de milho processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v). Frequência em função da temperatura, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

Tabela 6 - Temperaturas características obtidas no sensor acústico, com aquecimento de 2,0 °C/min, para 3 réplicas de amido processado a alta pressão (suspensão 2,5% w/v).

Temperaturas Características (°C) Réplicas de amido processado	T1	T2	T3	T4	T5
1	77,0	*NA	*NA	77,0	71,0
2	78,5	*NA	*NA	76,0	72,5
3	77,5	*NA	*NA	76,5	72,0
<b>Mediana</b>	77,5	*NA	*NA	76,5	72,0

\*NA – Não aplicável.

Na tabela 7 é feita uma comparação das temperaturas características no sensor acústico (à velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min) para amido de milho nativo e processado a alta pressão.

**Tabela 7 – Temperaturas características obtidas no sensor acústico para amido de milho nativo e processado a alta pressão (suspensões 2,5% w/v), com uma velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.**

Temperaturas Características (°C) Réplicas	T1	T2	T3	T4	T5
Nativo	73,5	83,0	86,0	77,0	71,5
Processado a alta pressão	77,5	*NA	*NA	76,5	72,0

\*NA – Não aplicável.

Depois de analisadas as amplitudes dos intervalos de temperatura T1 no amido nativo e processado a alta pressão, é possível afirmar que T1 é diferente para o amido nativo e processado. O mesmo não acontece para as temperaturas T4 e T5, não sendo estas diferentes para o amido nativo e processado a alta pressão.

Assim, é possível concluir que no início, com o aumento de temperatura, o comportamento da frequência é semelhante para ambos os amidos nativo e processado, verificando-se um aumento da frequência até à temperatura de 77,5 °C (T1) no amido processado. Nesta fase existe entrada de água para o interior do grânulo de amido e saída de amilose do seu interior. É necessário não esquecer, que o processamento a alta pressão é reconhecido como um processamento com libertação mínima de amilose do interior do grânulo [25]. A temperatura a que se inicia o aumento de viscosidade é mais elevada para o amido processado, possivelmente devido a uma estabilização do grânulo durante o processamento a alta pressão. Este comportamento é diferente daquele que foi descrito para o amido nativo e mostra que é agora necessária mais energia para a amilopectina fundir. A tendência de diminuição da frequência, que se iniciou aos 77,5 °C (T1), mantém-se ainda durante parte do arrefecimento da amostra até aos 76,5 °C (T4). O aumento da viscosidade dá-se não só na fase do aquecimento, mas enquanto a temperatura é suficientemente alta, continuando assim mesmo após a temperatura estar em fase descendente.

No amido processado a alta pressão, não se deteta qualquer variação nas propriedades viscoelásticas da amostra, que indicie a rutura dos grânulos de amido (subida da frequência). Isto possivelmente acontece devido a uma estabilização do grânulo de amido durante o processamento, que exigiria maiores temperaturas.

Existe um ligeiro aumento da frequência (diminuição da viscosidade) entre os 76,5 °C (T4) e 72,0 °C (T5), aumento este possivelmente relacionado com a cristalização de hélices de amilose com lípidos. O aumento da frequência neste momento dá-se às mesmas temperaturas do amido nativo.

Após os 72,0 °C a frequência volta a diminuir gradualmente, revelando o aumento da viscosidade da amostra até aos 30 °C.

Através desta experiência é possível assumir que as propriedades viscoelásticas do amido pré-processado a alta pressão são completamente diferentes quando comparadas com o amido nativo. A temperaturas mais elevadas, a suspensão tem um comportamento muito mais estável, com muito menor variação da viscosidade com a temperatura.

### 6.3 - Comportamento térmico do amido de arroz após diversos tratamentos de alta pressão

Posteriormente foi utilizado o mesmo sensor acústico para estudar as propriedades viscoelásticas de suspensões de amido de arroz (concentração 1,5% w/w), com processamentos a diferentes condições. Analisaram-se suspensões de amido de arroz nativo e processado a 400 MPa durante 15 minutos a várias temperaturas. A análise no sensor acústico foi efetuada a uma velocidade de aquecimento de 2 °C/min.

Na figura 19 é pode ver-se o comportamento de amido de arroz nativo, quando analisado no sensor acústico.

Amido de arroz nativo - velocidade de aquecimento 2,0 °C/min

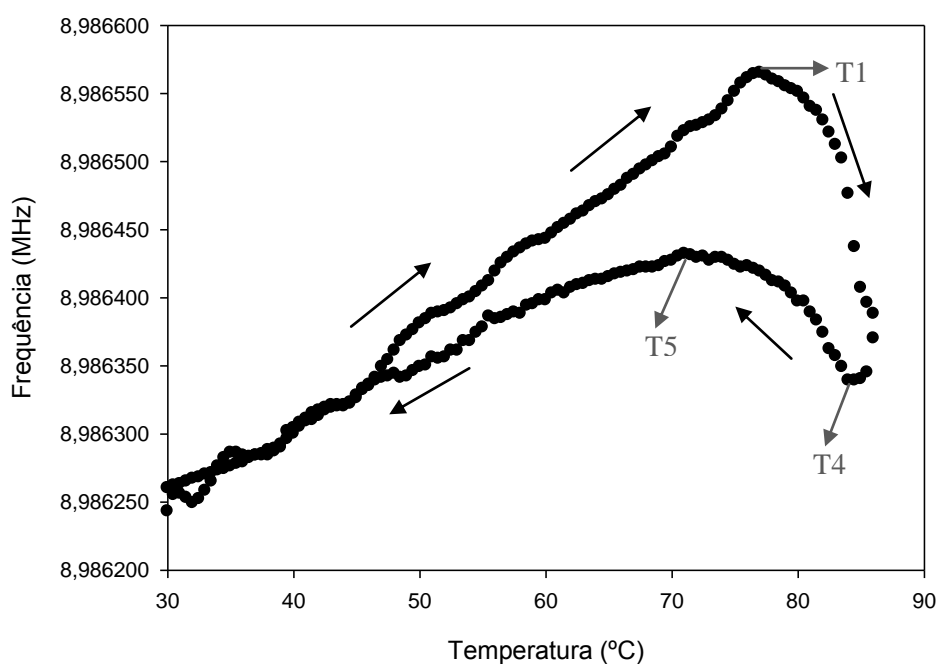


Figura 19 - Frequência em função da temperatura para amido de arroz nativo (suspensão 1,5% w/w), com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

É assim possível verificar um aumento de frequência até um máximo T1 (77 °C), nesta fase a água entra para dentro do grânulo de amido e amilose vai saindo para o exterior do grânulo.

Aos 77 °C (T1) a viscosidade da suspensão começa a aumentar (descida da frequência) até aos 84,5 °C (T4) da fase de arrefecimento. Neste momento é atingida a viscosidade máxima, onde possivelmente os grânulos se encontram inchados ao máximo, num meio com concentração elevada de amilose.

A partir desta temperatura a viscosidade diminui até aos 71 °C (T5), comprovado pelo aumento da frequência. Isto acontece possivelmente devido à cristalização das hélices de amilose com lípidos.

A viscosidade da suspensão volta de seguida a aumentar ate aos 30 °C.

Este tipo de comportamento é semelhante para todos os processamentos, mas as temperaturas a que ocorrem as mudanças de frequência são diferentes.

Na figura 20, 21, 22 e 23 pode ver-se a frequência de ressonância do cristal piezoelétrico em contacto com as suspensões de amido processadas às temperaturas de 5 °C, 10 °C, temperatura ambiente (23°C) e 34 °C, respetivamente.

Amido de arroz processado a 5°C - Velocidade de aquecimento 2,0 °C/min

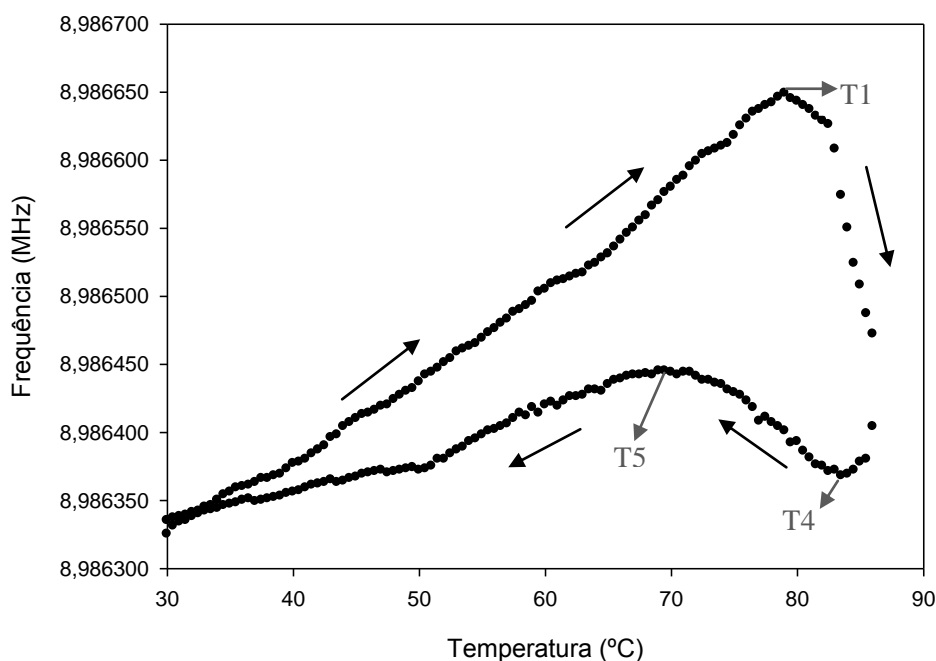
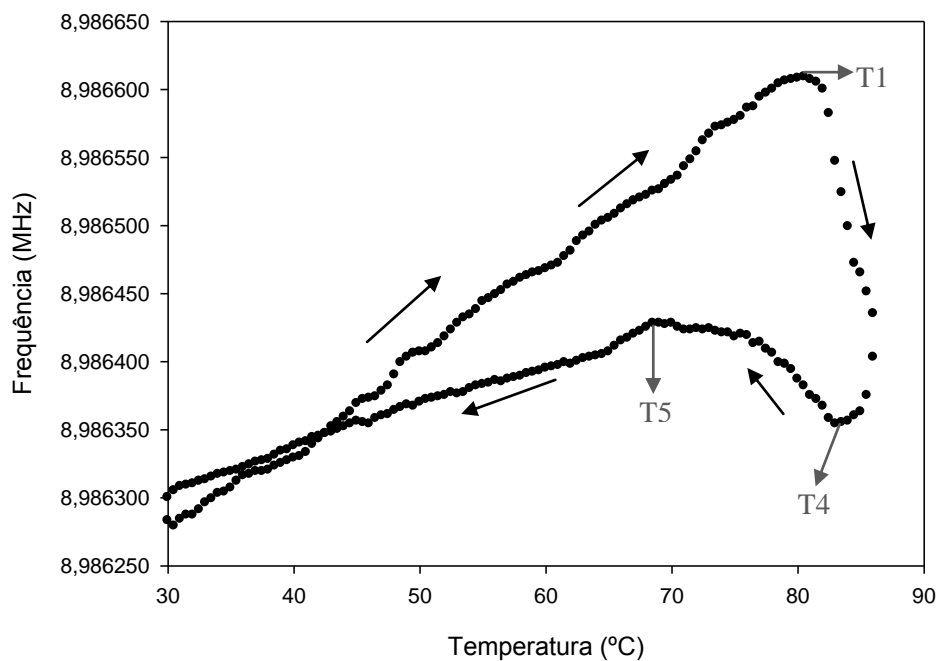


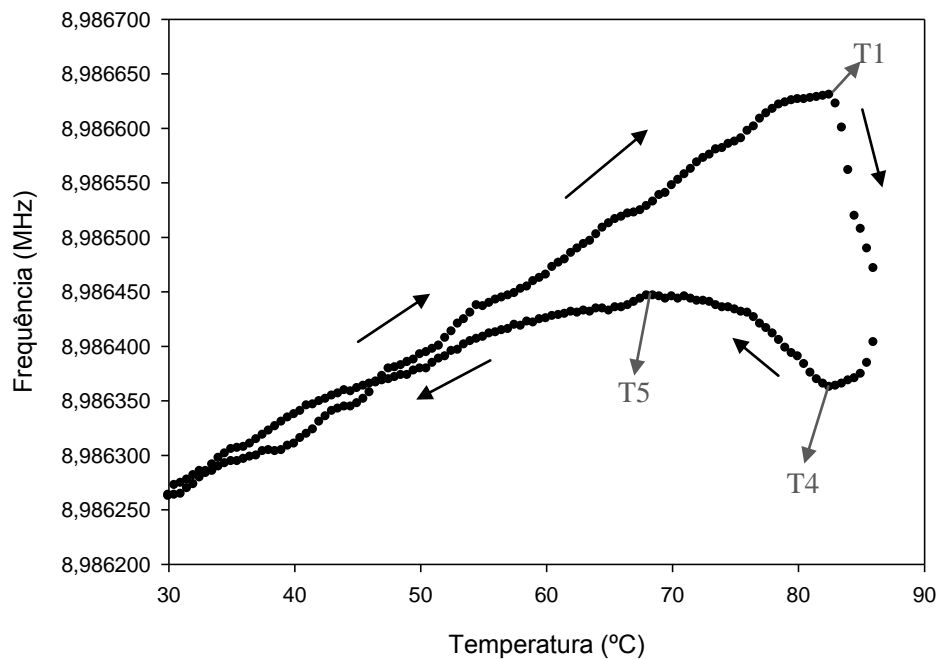
Figura 20 - Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a 5 °C, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

Amido de arroz processado a 10°C - Velocidade de aquecimento 2,0 °C/min



**Figura 21** - Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a 10 °C, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

Amido de arroz processado temp. ambiente - Velocidade de aquecimento 2°C/min



**Figura 22** - Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a temperatura ambiente, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

Amido de arroz processado a 34°C - Velocidade de aquecimento 2°C/min

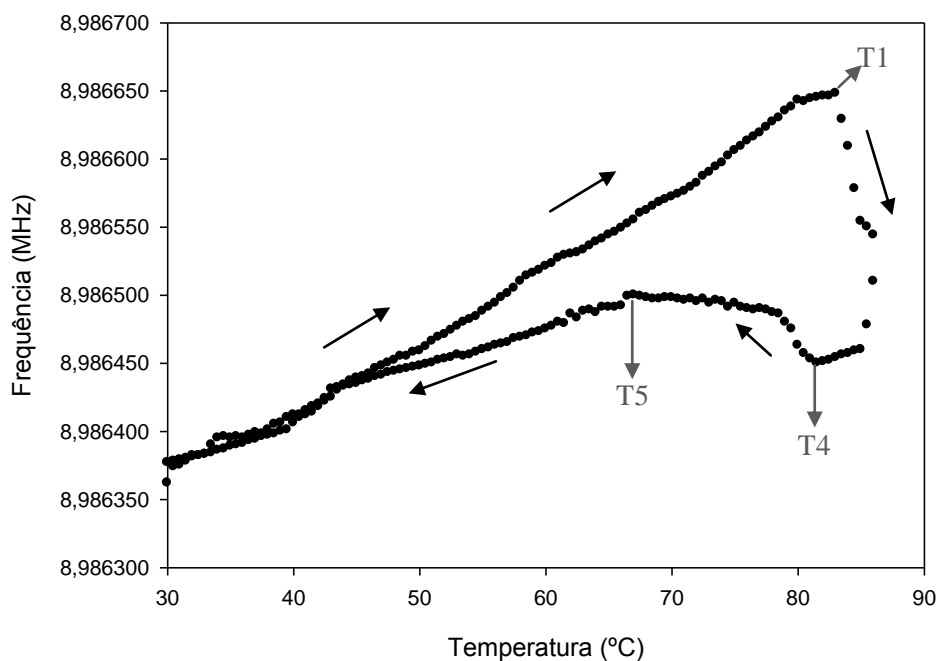


Figura 23 - Frequência em função da temperatura para amido de arroz (suspensão 1,5% w/w) processado a alta pressão (400 MPa, 15 minutos) a 34 °C, com velocidade de aquecimento de 2,0 °C/min.

Na tabela 8 encontra-se o resumo das temperaturas características no sensor acústico (3 réplicas) para amido de arroz nativo e processado a diferentes temperaturas.

Tabela 8 - Temperaturas características de 3 réplicas de amido de arroz nativo e processado a alta pressão (suspensões 1,5% w/w) a diferentes temperaturas. A temperatura evidenciada (negrito) corresponde à mediana das temperaturas características observadas.

Temperaturas características (°C)		T1	T4	T5
Amostra de amido				
<b>Amido nativo</b>		76,5/ <b>77,0</b> /77,0	84,5/ <b>84,5</b> /85,5	70,5/ <b>71,0</b> /71,5
<b>Amido processado: 400 MPa, 15 minutos</b>	5 °C	79,0/ <b>79,0</b> /79,5	83,5/ <b>83,5</b> /84,0	69,0/ <b>69,0</b> /69,5
	10 °C	80,0/ <b>80,5</b> /80,5	83,0/ <b>83,0</b> /83,0	68,0/ <b>68,5</b> /68,5
	23 °C (Ambiente)	82,0/ <b>82,5</b> /82,5	82,0/ <b>82,5</b> /82,5	68,0/ <b>68,0</b> /68,5
	34 °C	83,0/ <b>83,0</b> /83,5	81,0/ <b>81,5</b> /81,5	66,5/ <b>67,0</b> /67,0

Na tabela 8, a análise das amplitudes dos intervalos de temperatura T1, T4 e T5 para amido nativo e processado a alta pressão a diferentes temperaturas, permite concluir que cada uma das temperaturas (T1, T4 e T5) é diferente para cada uma das amostras, desde o amido nativo ao processado a diferentes condições, com exceção da temperatura T5 para o amido processado a 10 °C e à temperatura ambiente, cujos valores são coincidentes.

Assim, como é possível verificar na tabela 8, o processamento a alta pressão tem como consequência o aumento da temperatura (T1) à qual a amostra começa a aumentar a sua viscosidade. Também se pode concluir que quanto maior a temperatura de processamento da amostra de amido, mais alta será a temperatura (T1) à qual ocorre o aumento de viscosidade durante o aquecimento.

A passagem do aquecimento para arrefecimento da amostra é acompanhada pelo consecutivo aumento da viscosidade.

No arrefecimento, depois de ter sido atingido o primeiro máximo de viscosidade (T4), a viscosidade da amostra diminui (aumento da frequência) possivelmente devido à cristalização de hélices de amilose com lípidos. É possível verificar que quanto maior a temperatura do processamento de alta pressão, mais baixa é a temperatura a que se inicia a diminuição da viscosidade (T4) e mais baixa é a temperatura em que se inicia o novo aumento de viscosidade (T5). Assim, quanto maior a temperatura de processamento a alta pressão, mais baixas são as temperaturas a que ocorre a diminuição da viscosidade no arrefecimento.

Para o amido de arroz nativo, não se verificou qualquer indício de rutura dos grânulos, pela diminuição da viscosidade durante o aquecimento, como ocorre no amido de milho nativo. Possivelmente isto acontece devido à temperatura atingida na análise não ser suficiente para a rutura dos grânulos ou a sua rutura não é um fenómeno suficientemente forte para se verificar uma diminuição da viscosidade. O mesmo se verificou para as amostras de amido de arroz processado a alta pressão.

Importante o facto da frequência inicial ser sempre muito semelhante à frequência final, algo que não acontecia no amido de milho nativo e amido de milho processado a alta pressão. Isto é uma indicação de que apesar de se formarem novas ligações no interior do grânulo com o aquecimento e posterior arrefecimento, a viscosidade final é muito semelhante à inicial.



## 7 - Conclusão



Neste trabalho foi utilizado pela primeira vez um sensor acústico, com recurso a um cristal de quartzo piezoelétrico, no estudo do comportamento viscoelástico de suspensões de amido, quando sujeitas a aquecimento e posterior arrefecimento. Foram analisadas suspensões de amido de milho e amido de arroz, sem e com processamento a alta pressão.

O sistema utilizado permitiu identificar até um máximo de 5 temperaturas: T1, T2, T3, T4 e T5 (para amido de milho nativo). A temperatura T1 corresponde ao momento em que se inicia o aumento de viscosidade da amostra durante o aquecimento, T2 a temperatura à qual a suspensão atinge o máximo de viscosidade e os grânulos se encontram inchados ao máximo, na temperatura T3 todos os grânulos já sofreram a devida rutura pelo contínuo aquecimento. Na fase de arrefecimento, existe um aumento da viscosidade até à temperatura T4, temperatura esta onde se inicia uma diminuição da viscosidade até T5. Após a temperatura T5, a viscosidade volta a aumentar até ao final da análise.

Apesar deste novo método fornecer informações semelhantes às obtidas por métodos reológicos, o cisalhamento aplicado com este sistema é muito menor, sendo visto por isso muito diminuída a interferência do método de observação nos resultados. A utilização de um sensor acústico ligado a um oscilador e a um frequencímetro, que permitiria obter resultados análogos aos que se obtiveram neste trabalho com um analisador de impedâncias, apresenta ainda uma significativa vantagem económica.

Na análise dos resultados obtidos no amido de milho, foi possível verificar que a aplicação de um processamento de alta pressão provoca um aumento da temperatura T1 (77,5 °C para o amido processado a alta pressão e 73,5 °C para o amido nativo).

Para o amido nativo, o início do aumento de viscosidade (T1) ocorre à mesma temperatura a que os grânulos de amido deixam de apresentar birrefringência (74 °C), sendo assim possível explicar este aumento de viscosidade, pelo facto do grânulo perder a sua ordem molecular, permitindo a saída de uma importante quantidade de amilose que se encontrava aprisionada entre as lamelas cristalinas e entre a amilopectina. A perda de birrefringência para o amido processado a alta pressão (74 °C, a mesma temperatura do amido nativo) não corresponde à temperatura de início do aumento de viscosidade, possivelmente por uma estabilização do grânulo quando sujeito a processamento de alta pressão.

O máximo de viscosidade atingido durante o aquecimento (temperatura T2) corresponde ao momento em que os grânulos se encontram inchados ao máximo (pela contínua entrada de água) e intactos, num meio rico em amilose (que saiu do grânulo).

O processamento de alta pressão teve outras consequências nas propriedades viscoelásticas, entre elas destaca-se a ausência de diminuição de viscosidade a altas temperaturas (pela rutura completa dos grânulos de amido) e uma maior estabilidade da viscosidade a temperaturas mais elevadas. A ligeira diminuição de viscosidade verificada no arrefecimento, provocada pela possível cristalização de hélices de amilose com lípidos, surge a temperaturas semelhantes às aquelas em que ocorre no amido nativo.

No estudo do amido de milho, relativamente às velocidades de aquecimento aplicadas, conclui-se que quanto menor a velocidade de aquecimento, mais baixa a temperatura a que se inicia o aumento de viscosidade (T1) e mais baixa a temperatura a que se atinge o máximo de viscosidade (T2). Por outro lado, a temperatura a que todos os grânulos sofreram rutura (T3) é a igual para todas as velocidades aplicadas, este fenómeno não depende assim do fator tempo. Quanto menor a velocidade de aquecimento, maior a temperatura atingida pela suspensão de amido, originando maiores variações nas características viscoelásticas, que se traduz num maior aumento da viscosidade. No arrefecimento também foram verificadas diferenças. Quanto menor a velocidade de aquecimento, maiores intervalos de temperatura em que se verifica a diminuição da viscosidade, pela possível cristalização de hélices de amilose com lípidos. O início desta diminuição de viscosidade ocorre a temperaturas mais elevadas, para velocidades de aquecimento menores. Assim, os fenómenos que ocorrem no grânulo de amido, quando este se encontra na presença de água e é aquecido, dependem do fator tempo e temperatura.

Neste estudo de amido de milho, utilizaram-se mais três técnicas: a microscopia eletrónica de varrimento, a microscopia de luz polarizada e o DSC.

Na microscopia eletrónica de varrimento, foi possível verificar que o tamanho dos grânulos de amido de milho varia entre 7 e 15  $\mu\text{m}$ . Foi detetada a presença de poros na superfície de alguns grânulos que facilitam a difusão de água para o interior e a saída de amilose. No amido de milho processado a alta pressão verificou-se que os grânulos apresentam uma forma tipo “donut”, como consequência do processamento aplicado. Neste caso, o amido continua a manter a sua estrutura de grânulo, sem rompimento ou fissuras visíveis, mas o seu interior parece estar gelatinizado.

Através de microscopia de luz polarizada foi possível concluir que a temperatura de perda de birrefringência é igual para o amido de milho nativo e amido de milho processado a alta pressão (74 °C). Assim, conclui-se que o processamento de alta pressão não altera a temperatura de perda de ordem molecular, verificada pela perda de birrefringência.

O DSC permitiu detetar a temperatura a que se inicia a fusão da amilopectina (destruição das duplas hélices), a temperatura a que termina a fusão, assim como a quantidade de energia necessária para esta transição de fase. O DSC foi realizado a uma velocidade de aquecimento de 20 °C/min, muito superior à utilizada nas restantes técnicas, o que não permite a comparação das temperaturas de transição de fase com as temperaturas obtidas nas restantes técnicas. Pela bibliografia consultada [49], sabe-se que existe uma correspondência entre a microscopia de luz polarizada e DSC, onde a temperatura final de fusão ( $T_{\text{final}}$ ) corresponde ao momento em que 90% dos grânulos de amido perderam a birrefringência, o que permitiu concluir que a velocidade mais elevada do DSC leva a um aumento das temperaturas de transição de fase.

Comparando os resultados obtidos para o amido de milho nativo e processado a alta pressão, conclui-se que a temperatura a que se inicia a transição de fase é semelhante para as duas amostras de amido, ocorrendo o pico da curva de transição para o amido processado a temperatura mais baixa, finalizando a transição a temperatura mais elevada que o amido nativo. Este resultado deve-se possivelmente ao facto de, durante o processamento de alta pressão, existir uma destruição das estruturas cristalinas mais fracas e uma estabilização de alguns grânulos de amido pela formação de ligações mais fortes na estrutura cristalina. Relativamente à entalpia de transição, como era esperado, o valor de  $\Delta H$  é mais baixo para o amido processado a alta pressão, sendo necessário menos energia para a fusão completa da estrutura cristalina dos grânulos.

No estudo das propriedades viscoelásticas de suspensões de amido processadas a diferentes temperaturas usou-se amido de arroz. Utilizou-se o mesmo sensor acústico referido acima, com recurso a um cristal de quartzo piezoelétrico.

Foi possível concluir que o amido de arroz nativo tem um comportamento durante o início do aquecimento muito semelhante ao amido de milho nativo. No entanto, não apresenta nenhuma diminuição da viscosidade durante o aquecimento, pela rutura dos grânulos. A provável explicação para este facto estará na insuficiente temperatura atingida pela amostra por os grânulos serem mais resistentes à rutura, ou na ausência de variação de

viscosidade aquando da rutura dos grânulos de amido. No amido de arroz processado a alta pressão também não se verificou qualquer diminuição da viscosidade durante o aquecimento.

A temperatura do processamento de alta pressão afeta as propriedades viscoelásticas do amido, uma vez que quanto maior a temperatura do processamento, mais elevada é a temperatura ( $T_1$ ) a que se inicia o aumento da viscosidade.

Na fase de arrefecimento, verifica-se que quanto maior a temperatura de processamento, menor a temperatura ( $T_4$ ) a que ocorre a diminuição da viscosidade pela possível cristalização das hélices de amilose com lípidos.

Todas as amostras de amido de arroz, ao regressarem à temperatura ambiente, voltaram a uma frequência semelhante à inicial, o que demonstra que, apesar de porventura se terem formado ligações diferentes no interior do grânulo, as propriedades viscosas da suspensão são semelhantes às iniciais.

O processamento de alta pressão mostrou ser uma técnica bastante interessante para a modificação das propriedades do amido.

## Bibliografia

1. Copeland, L., Blazek, J., Salman, H., and Tang, M.C.M. (2009). Form and functionality of starch. *Food Hydrocolloids* 23, 1527-1534.
2. Funk, C.C., and Brown, M.E. (2009). Declining global per capita agricultural production and warming oceans threaten food security. *Food Secur.* 1, 271-289.
3. Gomiero, T., Paoletti, M.G., and Pimentel, D. (2010). Biofuels: Efficiency, Ethics, and Limits to Human Appropriation of Ecosystem Services. *J. Agric. Environ. Ethics* 23, 403-434.
4. Hartemink, A.E. (2007). *Soil science, population growth and food production: some historical developments*, (Dordrecht: Springer).
5. Tester, R.F., and Karkalas, J. (2001). The Effects of Environmental Conditions on the Structural Features and Physico-chemical Properties of Starches. *Starch - Stärke* 53, 513-519.
6. Burrell, M.M. (2003). Starch: the need for improved quality or quantity - an overview. *J. Exp. Bot.* 54, 451-456.
7. Francisco, G., and Juan, R.M. (2003). Gut flora in health and disease. *The Lancet* 361, 512-519.
8. Topping, D.L., and Clifton, P.M. (2001). Short-chain fatty acids and human colonic function: Roles of resistant starch and nonstarch polysaccharides. *Physiol. Rev.* 81, 1031-1064.
9. Ozcan, S., and Jackson, D.S. (2002). The impact of thermal events on amylose-fatty acid complexes. *Starch-Stärke* 54, 593-602.
10. Godet, M.C., Bizot, H., and Buléon, A. (1995). Crystallization of amylose--fatty acid complexes prepared with different amylose chain lengths. *Carbohydr. Polym.* 27, 47-52.
11. Jacobs, H., and Delcour, J.A. (1998). Hydrothermal modifications of granular starch, with retention of the granular structure: A review. *J. Agric. Food Chem.* 46, 2895-2905.
12. Denardin, C.C., and da Silva, L.P. (2009). Starch granules structure and its regards with physicochemical properties. *Cienc. Rural* 39, 945-954.
13. Buléon, A., Colonna, P., Planchot, V., and Ball, S. (1998). Starch granules: structure and biosynthesis. *International Journal of Biological Macromolecules* 23, 85-112.
14. Lansky, S., Kooi, M., and Schoch, T.J. (1949). Properties of the fractions and linear subfractions from various starches *J. Am. Chem. Soc.* 71, 4066-4075.
15. Eliasson, A.C. (2004). *Starch in food: structure, function and applications*, (Woodhead Pub.).
16. Hoover, R. (2001). Composition, molecular structure, and physicochemical properties of tuber and root starches: a review. *Carbohydr. Polym.* 45, 253-267.

17. Lindeboom, N., Chang, P.R., and Tyler, R.T. (2004). Analytical, biochemical and physicochemical aspects of starch granule size, with emphasis on small granule starches: A review. *Starch-Starke* 56, 89-99.
18. Oates, C.G. (1997). Towards an understanding of starch granule structure and hydrolysis. *Trends Food Sci. Technol.* 8, 375-382.
19. Jane, J.L. (2007). Structure of Starch Granules *J. Appl. Glycosci.* 54, 31-36.
20. Cairns, P., Bogracheva, T.Y., Ring, S.G., Hadley, C.L., and Morris, V.J. (1997). Determination of the polymorphic composition of smooth pea starch. *Carbohydr. Polym.* 32, 275-282.
21. Le Corre, D.b., Bras, J., and Dufresne, A. (2010). Starch Nanoparticles: A Review. *Biomacromolecules* 11, 1139-1153.
22. Sarko, A., and Wu, H.C.H. (1978). The Crystal Structures of A-, B- and C-Polymorphs of Amylose and Starch. *Starch - Stärke* 30, 73-78.
23. Katopo, H., Song, Y., and Jane, J.L. (2002). Effect and mechanism of ultrahigh hydrostatic pressure on the structure and properties of starches. *Carbohydr. Polym.* 47, 233-244.
24. Bauer, B.A., and Knorr, D. (2005). The impact of pressure, temperature and treatment time on starches: pressure-induced starch gelatinisation as pressure time temperature indicator for high hydrostatic pressure processing. *J. Food Eng.* 68, 329-334.
25. Buckow, R., Jankowiak, L., Knorr, D., and Versteeg, C. (2009). Pressure-Temperature Phase Diagrams of Maize Starches with Different Amylose Contents. *J. Agric. Food Chem.* 57, 11510-11516.
26. Hughes, T., Hoover, R., Liu, Q., Donner, E., Chibbar, R., and Jaiswal, S. Composition, morphology, molecular structure, and physicochemical properties of starches from newly released chickpea (*Cicer arietinum* L.) cultivars grown in Canada. *Food Res. Int.* 42, 627-635.
27. Boudries, N., Belhaneche, N., Nadjemi, B., Deroanne, C., Mathlouthi, M., Roger, B., and Sindic, M. (2009). Physicochemical and functional properties of starches from sorghum cultivated in the Sahara of Algeria. *Carbohydr. Polym.* 78, 475-480.
28. Oh, H.E., Hemar, Y., Anema, S.G., Wong, M., and Pinder, D.N. (2008). Effect of high-pressure treatment on normal rice and waxy rice starch-in-water suspensions. *Carbohydr. Polym.* 73, 332-343.
29. Huang, J., Schols, H.A., van Soest, J.J.G., Jin, Z., Sulmann, E., and Voragen, A.G.J. (2007). Physicochemical properties and amylopectin chain profiles of cowpea, chickpea and yellow pea starches. *Food Chem.* 101, 1338-1345.
30. Kaur, K., and Singh, N. (2000). Amylose-lipid complex formation during cooking of rice flour. *Food Chem.* 71, 511-517.
31. Tang, M.C., and Copeland, L. (2007). Analysis of complexes between lipids and wheat starch. *Carbohydr. Polym.* 67, 80-85.



32. Gelders, G.G., Duyck, J.P., Goesaert, H., and Delcour, J.A. (2005). Enzyme and acid resistance of amylose-lipid complexes differing in amylose chain length, lipid and complexation temperature. *Carbohydr. Polym.* **60**, 379-389.
33. Nimz, O., Gessler, K., Usón, I., Sheldrick, G.M., and Saenger, W. (2004). Inclusion complexes of V-amylose with undecanoic acid and dodecanol at atomic resolution: X-ray structures with cycloamylose containing 26 d-glucoses (cyclohexaicosaoose) as host. *Carbohydr. Res.* **339**, 1427-1437.
34. Snape, C.E., Morrison, W.R., Maroto-Valer, M.M., Karkalas, J., and Pethrick, R.A. (1998). Solid state C-13 NMR investigation of lipid ligands in V-amylose inclusion complexes. *Carbohydr. Polym.* **36**, 225-237.
35. Tufvesson, F., Wahlgren, M., and Eliasson, A.C. (2003). Formation of amylose-lipid complexes and effects of temperature treatment. Part 1. Monoglycerides. *Starch-Starke* **55**, 61-71.
36. Guraya, H.S., Kadan, R.S., and Champagne, E.T. (1997). Effect of rice starch-lipid complexes on in vitro digestibility, complexing index, and viscosity. *Cereal Chem.* **74**, 561-565.
37. Crowe, T.C., Seligman, S.A., and Copeland, L. (2000). Inhibition of enzymic digestion of amylose by free fatty acids in vitro contributes to resistant starch formation. *J. Nutr.* **130**, 2006-2008.
38. Englyst, H.N., Kingman, S.M., and Cummings, J.H. (1992). Classification and measurement of nutritionally important starch fractions. *Eur. J. Clin. Nutr.* **46**, S33-S50.
39. Brown, I.L., McNaught, K.J., and Moloney, E. (1995). Hi-maize (TM) - New directions in starch technology and nutrition. *Food Aust.* **47**, 272-275.
40. Bauer, B.A., Wiehle, T., and Knorr, D. (2005). Impact of high hydrostatic pressure treatment on the resistant starch content of wheat starch. *Starch-Starke* **57**, 124-133.
41. Brouillet-Fourmann, S., Carrot, C., and Mignard, N. (2003). Gelatinization and gelation of corn starch followed by dynamic mechanical spectroscopy analysis. *Rheol. Acta* **42**, 110-117.
42. Nelles, E.M., Dewar, J., Bason, M.L., and Taylor, J.R.N. (2000). Maize Starch Biphasic Pasting Curves. *J. Cereal Sci.* **31**, 287-294.
43. Vallons, K.J.R., and Arendt, E.K. (2009). Effects of high pressure and temperature on the structural and rheological properties of sorghum starch. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* **10**, 449-456.
44. Frazier, P.J., Donald, A.M., and Richmond, P. (1996). *Starch Structure and Functionality*, (Cambridge: The Royal Society of Chemistry).
45. Blaszczyk, W., Valverde, S., and Fornal, J. (2005). Effect of high pressure on the structure of potato starch. *Carbohydr. Polym.* **59**, 377-383.
46. Parker, R., and Ring, S.G. (2001). Aspects of the Physical Chemistry of Starch. *J. Cereal Sci.* **34**, 1-17.

47. Verissimo, M.I.S., Pais, A., and Gomes, M. (2010). Following HPMC gelation with a piezoelectric quartz crystal. *Carbohydr. Polym.* **82**, 363-369.
48. BeMiller, J.N., and Whistler, R.L. (1997). *Carbohydrate chemistry for food scientists*, 1 Edition, (American Association of Cereal Chemists).
49. Aparicio, C., Resa, P., Elvira, L., Molina-García, A.D., Martino, M., and Sanz, P.D. (2009). Assessment of starch gelatinization by ultrasonic and calorimetric techniques. *J. Food Eng.* **94**, 295-299.
50. Reddy, S.M., Jones, J.P., and Lewis, T.J. (1997). Use of combined shear and pressure acoustic waves to study interfacial and bulk viscoelastic effects in aqueous polymeric gels and the influence of electrode potentials. *Faraday Discuss.* **107**, 177-196.
51. Sabot, A., and Krause, S. (2002). Simultaneous quartz crystal microbalance impedance and electrochemical impedance measurements. Investigation into the degradation of thin polymer films. *Anal. Chem.* **74**, 3304-3311.
52. Bund, A., Chmiel, H., and Schwitzgebel, G. (1999). Determination of the complex shear modulus of polymer solutions with piezoelectric resonators. *PCCP Phys. Chem. Chem. Phys.* **1**, 3933-3938.
53. Bozzola, J.J., and Russell, L.D. (1999). *Electron microscopy: principles and techniques for biologists*, (Jones and Bartlett).
54. Patzelt, W.J. (1985). *Polarized light microscopy - Principles, instruments, applications*, 3 Edition, (Ernst Leitz Wetzlar GmbH).
55. Walter, R.H. (1998). *Polysaccharide association structures in food*, 1 Edition, (M. Dekker).
56. Hosney, R.C. (1998). *Principles of cereal science and technology*, 2 Edition, (American Association of Cereal Chemists).
57. Abiad, M., Carvajal, M., and Campanella, O. (2009). A Review on Methods and Theories to Describe the Glass Transition Phenomenon: Applications in Food and Pharmaceutical Products. *Food Engineering Reviews* **1**, 105-132.
58. Karim, A.A., Norziah, M.H., and Seow, C.C. (2000). Methods for the study of starch retrogradation. *Food Chem.* **71**, 9-36.
59. Liu, Y.T., Selontulyo, V.O., and Zhou, W.B. (2008). Effect of high pressure on some physicochemical properties of several native starches. *J. Food Eng.* **88**, 126-136.
60. Xie, F., Yu, L., Chen, L., and Li, L. (2008). A new study of starch gelatinization under shear stress using dynamic mechanical analysis. *Carbohydr. Polym.* **72**, 229-234.
61. Cooke, D., and Gidley, M.J. (1992). Loss of crystalline and molecular order during starch gelatinisation: origin of the enthalpic transition. *Carbohydr. Res.* **227**, 103-112.
62. Kudryashov, E.D., Hunt, N.T., Arikainen, E.O., and Buckin, V.A. (2001). Monitoring of Acidified Milk Gel Formation by Ultrasonic Shear Wave Measurements. High-Frequency Viscoelastic Moduli of Milk and Acidified Milk Gel. *Journal of dairy science* **84**, 375-388.

63. Buckin, V., and Kudryashov, E. (2001). Ultrasonic shear wave rheology of weak particle gels. *Advances in Colloid and Interface Science* 89-90, 401-422.
64. M. Reddy, S., P. Jones, J., and John Lewis, T. (1997). Use of combined shear and pressure acoustic waves to study interfacial and bulk viscoelastic effects in aqueous polymeric gels and the influence of electrode potentials. *Faraday Discuss.* 107, 177-196.
65. O'Sullivan, C.K., and Guilbault, G.G. (1999). Commercial quartz crystal microbalances - theory and applications. *Biosensors and Bioelectronics* 14, 663-670.
66. Kanazawa, K.K., and Gordon, J.G. (1985). Frequency of a quartz microbalance in contact with liquid. *Anal. Chem.* 57, 1770-1771.
67. Damos, F.S., Mendes, R.K., and Kubota, L.T. (2004). Applications of QCM, EIS and SPR in the investigation of surfaces and interfaces for the development of (BIO)sensors. *Quim. Nova* 27, 970-979.
68. Bizet, K., Gabrielli, C., and Perrot, H. (1999). Biosensors based on piezoelectric transducers. *Analisis* 27, 609-616.
69. Gomes, M.T.S.R. (2001). Is a quartz crystal microbalance really a mass sensor?, Volume 2, (Trivandum: Research Trends).
70. Claeys, W.L., Ann M, V.L.I., and Hendrickx, M.E. (2003). Review: are intrinsic TTIs for thermally processed milk applicable for high-pressure processing assessment? *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 4, 1-14.
71. Campus, M. (2010). High Pressure Processing of Meat, Meat Products and Seafood. *Food Engineering Reviews* 2, 256-273.
72. Bermúdez-Aguirre, D., and Barbosa-Cánovas, G. (2010). An Update on High Hydrostatic Pressure, from the Laboratory to Industrial Applications. *Food Engineering Reviews*, 1-18.
73. Mussa, D.M., and Ramaswamy, H.S. (1997). Ultra High Pressure Pasteurization of Milk: Kinetics of Microbial Destruction and Changes in Physico-chemical Characteristics. *Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie* 30, 551-557.
74. Stolt, M., Oinonen, S., and Autio, K. (2000). Effect of high pressure on the physical properties of barley starch. *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 1, 167-175.
75. Oh, H.E., Pinder, D.N., Hemar, Y., Anema, S.G., and Wong, M. (2008). Effect of high-pressure treatment on various starch-in-water suspensions. *Food Hydrocolloids* 22, 150-155.
76. Rubens, P., Snauwaert, J., Heremans, K., and Stute, R. (1999). In situ observation of pressure-induced gelation of starches studied with FTIR in the diamond anvil cell. *Carbohydr. Polym.* 39, 231-235.
77. Simonin, H., Marzouki, S., Guyon, C., Orlowska, M., Le-Bail, A., and de Lamballerie, M. (2009). Pasting properties of high-pressure-treated starch suspensions. *High Pressure Res.* 29, 726-731.

78. Vittadini, E., Carini, E., Chiavaro, E., Rovere, P., and Barbanti, D. (2008). High pressure-induced tapioca starch gels: physico-chemical characterization and stability. *Eur. Food Res. Technol.* 226, 889-896.
79. Douzals, J.P., Perrier-Cornet, J.M., Coquille, J.C., and Gervais, P. (2001). Pressure-Temperature Phase Transition Diagram for Wheat Starch. *J. Agric. Food Chem.* 49, 873-876.
80. Hibi, Y., Matsumoto, T., and Hagiwara, S. (1993). Effect of high pressure on the crystalline structure of various starch granules. *Cereal Chem.* 70, 671-676.
81. Xu, A., Ponte, J.G., and Chung, O.K. (1992). Bread crumb amylograph studies. 2. cause of unique properties. *Cereal Chem.* 69, 502-507.